



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA



Doctorado En Ciencias Biomédicas

**“Resistencia a la insulina inducida por exposición a
metamidofos: participación del estrés oxidativo”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

M. en C. MARCO ANTONIO RAMÍREZ VARGAS

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. Eugenia Flores Alfaro**

**CODIRECTORA DE TESIS
Dra. Ma. Elena Moreno Godínez**



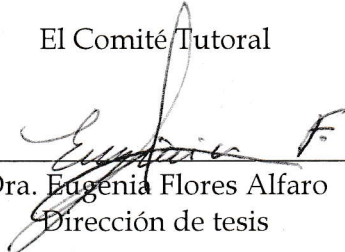


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 09 días del mes de enero del dos mil dieciocho, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **“Resistencia a la insulina inducida por exposición a Metamidofos: participación del estrés oxidativo”**, presentada por el alumno Marco Antonio Ramírez Vargas, para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial



 Dra. Eugenia Flores Alfaro
 Dirección de tesis



 Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero




 Dra. Isela Parra Rojas



 Dra. Mónica Espinoza Rojo



 Dra. Aurora Elizabeth Rojas García

Vo. Bo
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 **UAG**
 Coordinación del Posgrado de la Facultad de
 Ciencias Químico Biológicas
Coordinación 2014-2018

Vo. Bo
 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 **UAG**
 Unidad Académica de
 Ciencias Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2014 - 2018

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Bajo la codirección de:

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

La asesoría interna de:

Dra. Isela Parra Rojas

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dra. Mónica Espinoza Rojo

La asesoría externa de:

Dra. Aurora Elizabeth Rojas García

Profesora Investigadora de la Universidad Autónoma De Nayarit

Este trabajo fue parcialmente financiado por Red Temática de Toxicología de Plaguicidas (CONACYT-253789/271775).

Durante el periodo en el que cursó el Doctorado en Ciencias Biomédicas, el C. Marco Antonio Ramírez Vargas recibió la beca #276990 por parte del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez, gracias por la oportunidad de haber formado parte de su grupo de trabajo y por la confianza depositada para la culminación de este proyecto.

Dra. Eugenia Flores Alfaro gracias por su apoyo y guía durante el desarrollo de este trabajo y sobre todo por compartir sus conocimientos conmigo.

Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, gracias por sus observaciones y aportaciones para el mejoramiento de este trabajo.

Dra. Isela Parra Rojas gracias por sus aportaciones al trabajo y por ayudarme a visualizar un problema desde varios puntos de vista.

Dr. Luz del Carmen Alarcón Romero además gracias por sus consejos y las palabras de apoyo como tutora durante mi estancia en el Doctorado.

Dra. Mónica Espinoza Rojo gracias por sus aportaciones al trabajo.

A todos los amigos del Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental, gracias por hacer del laboratorio una estancia agradable.

DEDICATORIAS

A mi madre **Sra. Francisca Vargas Iturbide**, por qué siempre estas apoyándome, por ser siempre fuerte y ayudarme a salir adelante, mil palabras no bastarían para agradecerte todo lo que has hecho por mí.

A mis tías **Sra. Lucas Reyes, Sra. Marcelina Vargas**, por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento.

Al **Sr. Alfonso Cabañas Reyes** y la **Sra. Ma. Magdalena Reyes** gracias por apoyarme e impulsarme a seguir adelante.

A **Teresa Domínguez Reyes**, gracias por todo el apoyo que me has brindado en todo momento, por soportar los días de estrés y sobre todo por acompañarme en esta aventura.

A mis primos y tíos **Chaga, Lucio, Juan, Ana, Laura, Angélica Sr. Pedro Hernández, Sr. Filiberto Agüero, Sr. Guillermo Vargas**, por su apoyo.

A mi abuelo **Sr. Julián Vargas**, mi abuela **Sra. Juana Iturbide**.

A toda mi familia.

A mis amigos.

Marco Antonio Ramírez Vargas

	Índice	Página
1.- Resumen:		1
2.- Abstract		2
3.- Introducción.		3
Capítulo 1		
Methamidophos induces insulin resistance in HepG2 cells.		10
Capítulo 2.		
Participación del estrés oxidativo en la inducción de resistencia a la insulina en células HepG2 expuestas a metamidofos.		44
4.- Discusión.		73
5.- Referencias.		80
Anexo 1		
“Methamidophos Induces Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells”		87
Anexo 2		
Effects of exposure to malathion on blood glucose concentration: a meta-analysis		97
Anexo 3		
Efecto protector de N-acetil-cisteína sobre la inducción de citotoxicidad, estrés oxidativo y genotoxicidad en células HepG2 expuestas a metamidofos		108

1.- RESUMEN:

La resistencia a la insulina (RI) es la incapacidad que muestran ciertos tejidos para responder a la acción biológica de la insulina; esta condición se ha relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades crónico degenerativas. Las causas de la RI son múltiples, he incluyen factores genéticos y de estilo de vida. Sin embargo; recientes estudios han demostrado que la exposición a los plaguicidas organofosforados (OP) es un factor de riesgo para el desarrollo de (IR). El metamidofos (MET) es un OP ampliamente utilizado en el mundo, un mecanismo de toxicidad asociado con este OP es la inducción de estrés oxidativo. El estrés oxidativo es una condición frecuentemente observada en pacientes con IR. Por lo cual es probable que la inducción de estrés oxidativo sea un mecanismo asociado al desarrollo de RI asociada con la exposición a OP. El objetivo de este trabajo fue determinar si MET podría generar IR en las células HepG2. Además, investigamos la relación entre IR y estrés oxidativo usando un antioxidante. La citotoxicidad se evaluó con ensayos de MTT y Rojo Neutro, los cambios en los niveles de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS), malonaldehído (MDA), glutatión reducido (GSH) y daño genotóxico se evaluaron como biomarcadores del estrés oxidativo. Mientras que los niveles de glucógeno, el contenido de lípidos y la captación, consumo y producción de glucosa, los niveles de GLUT2 y la translocación de GLUT4 en células HepG2 se evaluaron como indicadores de resistencia a la insulina. Los resultados mostraron que MET indujo estrés oxidativo y resistencia a la insulina en células HepG2. Por otro lado, el uso de antioxidantes disminuye el estrés oxidativo y los biomarcadores de resistencia a la insulina en el modelo celular. Estos resultados sugieren que MET podría inducir resistencia a la insulina a través de la inducción de estrés oxidativo.

2.- Abstract

Insulin resistance (IR) is the incapacity observed in tissues for responding to biological activity induced by insulin stimulation; this condition has been linked with the development of several chronic diseases. The causes of IR included several risk factors such as genetic background and lifespan style. However, recent studies have shown that the exposure to organophosphates pesticides (OP) is a risk factor involved in the induction of insulin resistance. Methamidophos is an OP widely used, this OP is capable of inducing oxidative stress. In another hand, oxidative stress is a condition frequently observed in IR patients. It is possible; therefore, that the induction of oxidative stress is a mechanism through which OP induces IR. The objective of this work was to evaluate whether MET is capable to generate IR in HepG2 cells. In addition, we investigated the relationship between IR and oxidative stress using an antioxidant (specific for ROS). Cytotoxicity was assessed with MTT and Neutral Red assays, changes in the levels of reactive intracellular oxygen species (ROS), malonaldehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and genotoxic damage were evaluated as biomarkers of oxidative stress. While glycogen levels, lipid content and uptake/consumption/production of glucose, GLUT2 levels and the translocation of GLUT4 in HepG2 cells were evaluated as indicators of insulin resistance. The results showed that MET induced oxidative stress and insulin resistance in HepG2 cells. On the other hand, the use of antioxidants decreases oxidative stress and biomarkers of insulin resistance in the cellular model. These results suggest that MET is capable to induce insulin resistance through the induction of oxidative stress.

3.- Introducción.

La resistencia a la insulina (RI), se define como la incapacidad que muestran los tejidos para responder normalmente a la acción biológica de la insulina, alterándose la captación de glucosa en el tejido adiposo, muscular y hepático, la producción de glucosa/ácidos grasos en el hígado y la lipólisis en los adipocitos, estas alteraciones con llevan a la perturbación del metabolismo de lípidos y de carbohidratos (Tangvarasittichai 2015a). La RI se caracteriza por estados prolongados de hiperglucemia y elevadas concentraciones de ácidos grasos libres en sangre, además existe un estado de hiperinsulinemia. Se considera a la RI como un componente del síndrome metabólico (SM), y como un factor de riesgo para el desarrollo de diferentes enfermedades crónico degenerativas como la obesidad, hipertensión arterial, cáncer, dislipidemias, ateroma, y principalmente la diabetes tipo 2 (DT2) (Facchini et al. 2001), de manera tal que los individuos con mayor número de enfermedades crónico degenerativas poseen el mayor grado de RI ((Hanley et al. 2002).

Las causas de la RI se han asociado a factores considerados como “clásicos” entre los que destacan la presencia de factores genéticos (Warram et al. 1990), de estilo vida como el sedentarismo (Taguchi and White 2008);(Sarvas et al. 2015) y el consumo de alimentos ricos en grasa y/o carbohidratos (Merat et al. 1999; Guerre-Millo 2004; Cordain et al. 2005; Prada et al. 2005). Estos factores pueden interaccionar, e inducir efectos lipotóxicos, glucotóxicos y/o inducir estrés oxidativo/nitrosactivo como mecanismos asociados a la inducción de RI.

El receptor de la insulina está compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β , las primeras son extracelulares y las segundas poseen dominios extracelulares, intramembranales e intracelulares, estas subunidades se encuentran unidas por enlaces disulfuro, este receptor es una glucoproteína con actividad tirosina cinasa intrínseca (McKern et al. 2006). Cuando la insulina se une a la sub-unidad α se inducen cambios conformacionales que propician el acercamiento de ambas

subunidades, aumentando la actividad de fosforilación de la subunidad β principalmente en residuos de tirosina. La fosforilación de la Tyr 960 en la subunidad β proporciona un sitio de unión a los sustratos del receptor de insulina (IRS) por medio de proteínas de unión a fosfotirosina. La unión de IRS al receptor de insulina induce la fosforilación de IRS en residuos de tirosina, una vez fosforilados los IRS se unen a la subunidad p85 de la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K), esta unión se establece por la presencia de dominios SH2 en p85. PI3K cataliza la fosforilación de los fosfoinositoles para formar el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Jackson et al. 1995), lo cual activa cinasas dependientes de fosfoinositoles "PDK" la cual activa a Akt (PKB), Akt activada es capaz de inducir la síntesis de glucógeno, al fosforilar al represor GSK3 (Glucógeno sintasa cinasa 3,) en residuos de serina-9/21, lo cual inhibe su actividad represora sobre la glicógeno sintetasa (revisado en(Beurel et al. 2015), también activa la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) a la membrana plasmática, por la fosforilación/activación de AS160, proteína implicada en la translocación del GLUT4, la duración del estímulo derivado de la unión con la insulina y su receptor son regulados por las fosfatasa de proteínas y de fosfolípidos, la desregularización de estas vías de señalización están asociadas con el desarrollo de intolerancia a la glucosa (White 2003).

La señalización inducida por la insulina se termina por la regulación negativa de los componentes activados durante el estímulo con insulina, un mecanismo es por la fosforilación negativa en sitios de treonina/serina de los IRS induciendo su degradación (Pederson et al. 2001) y/o disminuye su unión al receptor de la insulina, con la subsecuente reducción de la actividad de PI3K reduciéndose la señal originada por la insulina (Mothe and Van Obberghen 1996). También se conoce que factores activados por los IRS como Akt puede regular negativamente a su activador PI3K, al incrementar su unión con los IRS, lo cual genera que PI3K fosfore a los IRS en sitios de serina/treonina inhibiendo su actividad (Li et al. 1999). Por otro lado PI3K puede activar a PKC ζ lo que incrementa la fosforilación en sitios de serina treonina disminuyendo la unión de los IRS al receptor de insulina, (Liu et al. 2001), otras fosfocinasas también pueden interrumpir la vía de señalización, tal es el caso de JNK-C una MAP kinasa que puede inhibir la función de los IRS al fosforilarlos en

residuos de serina (Lee et al. 2003a). Otros reguladores negativos de la vía de señalización de la insulina son las proteínas tirosina fosfatasa (PTP), las cuales están implicadas en la desfosforilación de los sitios de tirosina de los IRS (Asante-Appiah and Kennedy 2003). Además se ha demostrado que la inhibición de la expresión de receptores con función de PTP incrementa la captación de glucosa, la funcionalidad y la vida media de la actividad de los IRS (Krüger et al. 2015).

Las bases patológicas implicadas en el desarrollo de la RI han sido estudiadas usando diversos enfoques entre ellos el “enfoque lipocéntrico” propone que la RI es generada por los depósitos de grasa ectópica excesiva, lo que induce el incremento de ácidos grasos libres (AGL) en sangre y el subsecuente aumento en los niveles de diacilglicerol incrementa la actividad de PKC, la cual disminuye la fosforilación en sitios de tirosina de los IRS e incrementa la fosforilación en sitios de serina, disminuyendo la función de los IRS, reduciendo la actividad de PI3K/Akt lo cual regula negativamente la fusión del GLUT4 a la membrana de la célula (Mitra et al. 2008).

A su vez el incremento de AGL se asocia con el aumento intracelular de la acetil coenzima A y citrato sintasa disminuyéndose la actividad de la piruvato deshidrogenasa y fosfofructocinasa reduciéndose el metabolismo oxidativo de la glucosa y la glucólisis (Cahová et al. 2007). La disminución en la glucólisis y fosforilación oxidativa conducen a la inducción de estrés/daño oxidativo promoviendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias las cuales pueden incrementar la actividad de JNK un regulador negativo de los IRS, todos estos eventos inducen RI (Mitra et al. 2008).

Por otro lado el “enfoque glucocéntrico” propone que estadios de hiperglucemia puede generar un efecto glucotóxico, que conlleva a la RI (Robertson et al. 2004), ya que las altas concentraciones de glucosa promueven su reacción con los grupos amino de proteínas celulares como la glucosamina-6-fosfato (Thornalley et al. 1999), generándose la producción de metabolitos reactivos “productos finales de glicosilación avanzada (AGEs)”, los AGEs pueden activar directamente a JNK, un represor negativo de la vía de señalización de la insulina (Kaneto et al. 2002).

Recientemente se ha demostrado que los niveles sanguíneos de AGEs se asocian con el incremento en la RI (Xu et al. 2015), por otro lado durante estados de hiperglucemia se induce la apoptosis en las células β -pancreáticas (Lee and Pervaiz 2007), la muerte celular de las células β -pancreáticas, la disminución en la síntesis de insulina y la subsecuente inducción de reguladores negativos de la vía de señalización de la insulina, son las principales causas de la inducción de RI por la glucotoxicidad.

Por otra parte las especies reactivas del oxígeno (ROS; sustancias químicas derivadas del metabolismo del O_2) y las especies reactivas del nitrógeno (RNS), se han involucrado en la patofisiología de la inducción de RI. Las ROS pueden mimetizar el efecto de la insulina en adipocitos e inducir la activación del transportador de la glucosa, incrementar la síntesis de lípidos y glucógeno e inhibir la lipólisis (May and de Haen 1979). Concentraciones menores a 30 nM de H_2O_2 estimula la fosforilación en tirosina del receptor de insulina, aumentando su actividad (Heffetz et al. 1992) ,sin embargo la prolongada exposición a altas concentraciones de ROS, se asocian con la inhibición de la acción de la insulina, sugiriendo que la vía de señalización requiere de bajas concentraciones de ROS (basales), además cuando se induce el estrés oxidativo (incremento desmesurado de ROS) la señalización se inhibe (Hansen et al. 1999), un mecanismo que se han implicado en la inducción de RI por el estrés oxidativo es por la hiper-activación de proteínas tirosina fosfatasas (PTP) las cuales reducen la actividad de los IRS (Li and Pang 2014), por otra parte el incremento desmesurado de ROS se asocia con la activación de JNK, un regulador negativo de la vía de señalización de la insulina (Shen y Liu., 2006).

En relación al estrés nitrosactivo se ha demostrado que en estadios de hiperglucemia se incrementa la actividad de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) y la subsecuente producción de peroxinitrito el cual es una RNS (Sharma et al. 1995), en pacientes con DT2 existe una elevada producción de óxido nítrico (ON), nitratos (ON_2^-) y nitritos (ON_3^-) generados por la actividad de iNOS, el incremento de RNS genera un incremento en la S-nitrosilación (Torres et al. 2004), la S-nitrosilacion de

los IRS inducen su degradación (Sugita et al. 2005), también la S-nitrosilación en tirosinas de Akt (PKB) regula negativamente la vía de señalización/acción de la insulina (Yasukawa et al. 2005).

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias creadas con el fin de prevenir, destruir, repeler o controlar plagas (EPA, 2012), entre los plaguicidas más utilizados destacan los plaguicidas organofosforados (OP). Los OP, son considerados como los principales contaminantes ambientales, por ser ampliamente utilizados en todo mundo para incrementar la producción agrícola y en el control de enfermedades transmitidas por vector (Ecobichon, 2001; Schreinemachers y Tipraqsa, 2012). En México tan solo en el 2011 se usaron 3.3 toneladas de plaguicidas por cada 1000 habitantes (FAO, 2011) de los cuales el metil-paration (MEPA) y metamidofos (MET) fueron los OP más utilizados (Sánchez-Guerra et al. 2011a). De esta manera el uso excesivo de estos compuestos ha provocado daños en el ambiente y en la salud de la población (Aktar et al., 2009).

Se ha estimado la existencia de más de 1 000 ingredientes activos de OP, pese a su agrupación en familias, cada uno posee propiedades toxicológicas diferentes estos pueden afectar varios órganos como el páncreas, hígado, músculo los cuales están implicados en la acción de la insulina (Slotkin 2011). Como se ha mencionado anteriormente la RI es un factor de riesgo para el desarrollo de varias comorbilidades, sus causas son multifactoriales sin embargo la inevitable exposición a xenobióticos se ha propuesto como un factor que contribuye al desarrollo de esta enfermedad (Hectors et al. 2013). La exposición aguda y crónica a OP pueden inducir efectos lipotóxicos, glucotóxicos y la inducción de estrés oxidativo/nitrosactivo por lo que son considerados como contaminantes con probable capacidad de inducir resistencia a la insulina.

Como se ha mencionado anteriormente las causas de la inducción de RI son varias en las cuales se incluyen los efectos glucotóxicos, lipotóxicos e inducción de estrés oxidativo/nitrosactivo, estos efectos también se han asociado a la exposición aguda, y/o crónica a OP, por lo que se considera que la RI es una consecuencia

fisiopatológica de la exposición a OP (Lasram et al. 2014a). En este sentido estudios de cohorte realizados por (Montgomery et al. 2008), demostraron que la exposición ocupacional a OP incrementa el riesgo de padecer DT2 en población ocupacionalmente expuesta, por su parte (Saldana et al. 2007), encontraron que la exposición durante el primer trimestre a malation incrementaba significativamente el riesgo de padecer diabetes gestacional. Recientemente (Raafat et al. 2012), reportaron que la exposición crónica a malation induce RI en población ocupacionalmente expuesta.

En modelos animales se ha encontrado que la exposición a monocrotofos y malation, inducen un incremento de la concentración de glucosa en sangre, el incremento es considerado como transitorio. Se ha sugerido que la hiperglicemia ocurre por la transformación de glucógeno a glucosa, evidencia de ello es la hiperactivación de enzimas implicadas en la glucogenólisis como la glucogenofosforilasa y la disminución en el contenido de glucógeno post-exposición a OP (Matin and Husain 1987); (Teimouri et al. 2006). Se ha reportado que el incremento en la glucosa por exposición a OP se asocia con una hipersecreción compensatoria de insulina sin que esta sea capaz de disminuir los niveles de glucosa y de inhibir la acción glucogenolítica del hígado (Rezg et al. 2010).

La exposición a OP también se ha asociado con la disfunción de las células β -pancreáticas, (Pournourmohammadi et al. 2005), reportaron que el malation induce la hipersecreción de insulina en ratas expuestas, también se conoce que la exposición crónica a malation induce una hiper-activación de las glucoquinasas y glutamato deshidrogenasa, enzimas implicadas en la regulación de la excreción de insulina, la hiperinsulinemia y la hiperglicemia son considerados como los principales factores de riesgo para el desarrollo de DT2.

La alteración en la secreción de insulina por la exposición a OP se debe a la sobre estimulación de los receptores colinérgicos y muscarínicos localizados en la superficie de las células β -pancreáticas, los cuales al ser estimulados inducen la secreción de insulina. Sin embargo, la exposición a OP puede ejercer diferentes mecanismos no colinérgicos que están implicados en la RI inducida por OP

(Vosough-Ghanbari et al. 2007), se ha sugerido que la inducción de estrés oxidativo en el páncreas puede ser un mecanismo no colinérgico para el dimetohato un OP (Kamath and Rajini 2007), también se ha observado que el malation induce RI en hígado, y que cuando se co-administra un antioxidante la RI no se genera (Lasram et al. 2014c), lo que establece la posibilidad de que la RI en los tejidos diana sea atribuido a la inducción de estrés oxidativo/nitrosactivo.

Considerando que en México se utilizan 3.3 millones de toneladas de plaguicidas de tipo OP siendo el metamidofos el OP de uso más frecuente, es de interés determinar si este plaguicida es capaz de resistencia a la insulina en células HepG2 así como evaluar su relación con la inducción de estrés oxidativo .A continuación se presentan los resultados obtenidos.

Dear Dr. Marco Antonio Ramírez-Vargas,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Food and Chemical Toxicology

Title: Methamidophos induces insulin resistance in HepG2 cells

Corresponding Author: Ma. Elena Moreno-Godínez

Co-Authors: Marco Antonio Ramírez-Vargas; Eugenia Flore-Alfaro ; Isela Parra-Rojas;
Yanet Romero-Ramirez; Iris Paola Guzmán-Guzmán; Napoleón Navarro-Tito ;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register

here: <https://ees.elsevier.com/fct/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Marco Antonio &lname=Ramírez-Vargas&email=marco-qbp@hotmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/fct/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=marco-qbp@hotmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at emoreno20@hotmail.com.

Thank you,

Food and Chemical Toxicology

Manuscript Number:

Title: Methamidophos induces insulin resistance in HepG2 cells

Article Type: Full Length Article

Keywords: methamidophos; insulin resistance; glucose uptake; GLUT4 translocation; neutral lipids; GLUT2 levels.

Corresponding Author: Professor Ma. Elena Moreno-Godínez,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Marco Antonio Ramírez-Vargas

Order of Authors: Marco Antonio Ramírez-Vargas; Eugenia Flores-Alfaro ; Isela Parra-Rojas; Yanet Romero-Ramirez; Iris Paola Guzmán-Guzmán; Napoleón Navarro-Tito ; Ma. Elena Moreno-Godínez

Abstract: Insulin resistance is a metabolic condition that has been linked to multifactorial risk factors such as the exposure to organophosphates pesticides (OP). Methamidophos (MET) is one of the most widely used OP in the world. The aim of this study was to evaluate whether MET can induce insulin resistance in human liver carcinoma (HepG2) cells. The HepG2 cells were exposed to MET (0-500 mg/L), for 48- or 96-h. The cell viability was determined by 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The glycogen levels, lipid content, and glucose uptake/consumption/production, the GLUT2 levels and GLUT4 translocation in HepG2 cells were assessed as indicators of insulin resistance. The results of MTT assay indicated that MET no induced cytotoxicity in HepG2 cells at 48- or 96-h. However, the exposure to MET increased the lipid content and glucose production in HepG2 cells and significantly decreased the GLUT2 and glycogen levels. In addition, MET decreases insulin-stimulated glucose uptake/consumption, and lessen insulin-stimulated GLUT4 translocation to the plasma membrane. These results suggest that MET could be associated to development of insulin resistance.

Suggested Reviewers: Sonia Ramos

Institute of Food Science and Technology and Nutrition
s.ramos@ictan.csic.es

Dr. Sonia Ramos has large experience in the measure of insulin resistance in hepatic cells

Mohammad Abdollahi

Tehran University of Medical Sciences
Mohammad.Abdollahi@UToronto.Ca

Dr. Abdollahi has large experience in the metabolic disorders associated with pesticide exposure.

Sara Mostafalou

Ardabil University of Medical Sciences
s.mostafalou@pharmacy.arums.ac.ir

Dr. Mostafalou has large experience in the study of insulin resistance associated with pesticide exposure.

Mohamed Montassar Lasram
El Manar University Tunis
lasram_montassar@yahoo.fr

Dr. Lasram has large experience in the study of insulin resistance associated with organophosphates pesticide exposure.

Isabel Cordero Herrera
Karolinska Institutet
cordero.isa@gmail.com

Dr. Cordero has large experience in the study of insulin resistance on in vitro systems.

Opposed Reviewers:



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS



May 2018.

Ph. D. José L. Domingo
Editor-in-Chief
Food and Chemical Toxicology

On behalf our team of collaborators, I am pleased to submit the manuscript entitled **“Methamidophos induces insulin resistance in HepG₂ cells”** by: Marco Antonio Ramírez-Vargas, Eugenia Flores-Alfaro , Isela Parra-Rojas , Yanet Romero-Ramirez, Iris P Guzmán–Guzmán, Napoleón Navarro-Tito and Ma. Elena Moreno-Godínez

In the present manuscript we report the data from an original study that evaluated the role of methamidophos exposure in the induction of insulin resistance. The data obtained in this work suggested that the exposure to methamidophos induced insulin resistance on HepG₂ cells. This work concordance with a large evidence that showed the relation between organophosphates pesticides exposure and developed of insulin resistance. Supporting the need for performing more studies focused on establish the pesticide exposure as a potential risk factor for developing metabolic alterations such as diabetes.

We believe that the results of this study will be of interest for your readership, and ask you to consider this manuscript for publication in Food and Chemical Toxicology. The manuscript is an original study, it has not been previously published, and is not under consideration for publication elsewhere. All the authors have disclosed any potential competing financial interests regarding the submitted article. All the authors have read the manuscript, agree that the work is ready for submission to this journal, and they accept the responsibility for the manuscript's contents.

Sincerely,

Ma. Elena Moreno Godínez
Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental.

Unidad Académica De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, Mexico. Av. Lazaro Cardenas s/n, Ciudad Universitaria Chilpancingo, Guerrero, Mexico 39070.

Telephone: (52) (747) 4725503

Fax: (52) (747) 4725503

E-mail: emoreno20@hotmail.com

Methamidophos induces insulin resistance in HepG2 cells.

Marco Antonio Ramírez-Vargas¹, Eugenia Flores-Alfaro², Isela Parra-Rojas³, Yanet Romero-Ramirez⁴, Iris P Guzmán–Guzmán³, Napoleón Navarro-Tito⁵ and Ma. Elena Moreno-Godínez^{1,*}

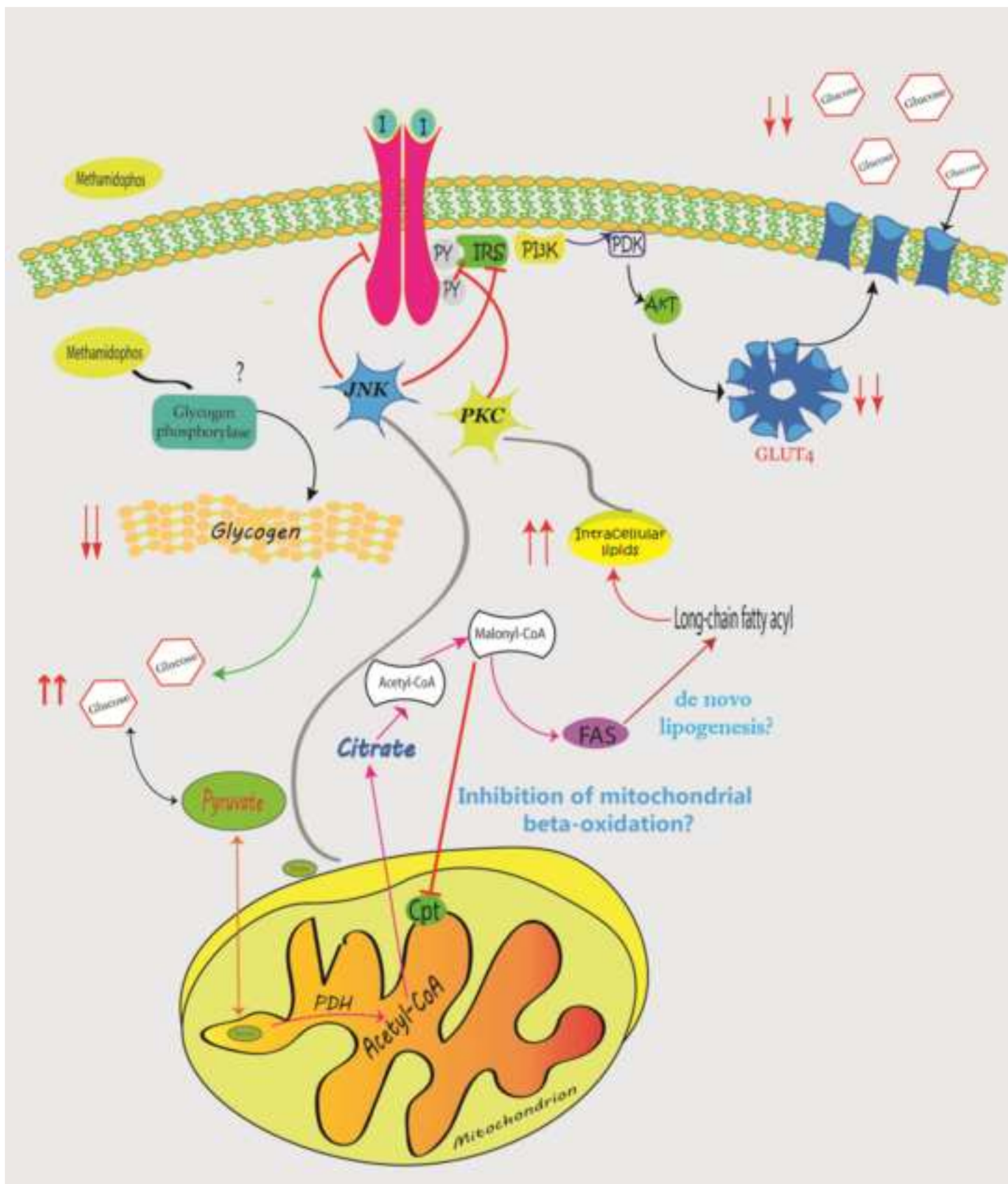
1. Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México.
2. Laboratorio de Investigación en Epidemiología Clínica y Molecular. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, México.
3. Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, México.
4. Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México.
5. Laboratorio de Biología Celular del Cáncer. Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México.

Corresponding author:

Ma. Elena Moreno-Godínez, PhD. Laboratorio de Toxicología y Salud ambiental, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México. Av. Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria Chilpancingo, Guerrero, México 39089.

Telephone: (52) (747) 4725503

E-mail: emoreno20@hotmail.com



Abstract: Insulin resistance is a metabolic condition that has been linked to multifactorial risk factors such as the exposure to organophosphates pesticides (OP). Methamidophos (MET) is one of the most widely used OP in the world. The aim of this study was to evaluate whether MET can induce insulin resistance in human liver carcinoma (HepG2) cells. The HepG2 cells were exposed to MET (0–500 mg/L), for 48- or 96-h. The cell viability was determined by 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The glycogen levels, lipid content, and glucose uptake/consumption/production, the GLUT2 levels and GLUT4 translocation in HepG2 cells were assessed as indicators of insulin resistance. The results of MTT assay indicated that MET no induced cytotoxicity in HepG2 cells at 48- or 96-h. However, the exposure to MET increased the lipid content and glucose production in HepG2 cells and significantly decreased the GLUT2 and glycogen levels. In addition, MET decreases insulin-stimulated glucose uptake/consumption, and lessen insulin-stimulated GLUT4 translocation to the plasma membrane. These results suggest that MET could be associated to development of insulin resistance.

Keywords: methamidophos; insulin resistance; glucose uptake; glucose consumption; glycogen levels; GLUT4 translocation; neutral lipids; GLUT2 levels

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Introduction

The increase of liver lipid content, the uncontrollable hepatic glucose production, and the reduction in glucose uptake/consumption and glycogen levels are frequently conditions observed in individuals with insulin resistance (**Birkenfeld and Shulman, 2014**). In animals models, the liver-specific insulin resistance lead to an impaired metabolism of lipids and carbohydrates, this result in dyslipidemias and hyperglycemias, these effects were not observed on animal with insulin resistance in muscle tissue or adipose tissue (**LeRoith and Accili, 2008**). This data suggesting that the induction of hepatic insulin resistance, with the subsequent reduction in glucose uptake/consumption and glycogen levels, and the increase in lipid content and glucose production, could be the first event that triggers the insulin resistance on peripheral tissue (**Samuel and Shulman, 2016**).

Insulin resistance is associated with multiples risk factors such as genetic factors, sedentary lifestyle, western diet and obesity. In addition, the exposure to environmental contaminants has gained importance as a risk factor in the development of insulin resistance (**Hectors et al., 2013; Mostafalou, 2016**).

Epidemiological studies have reported a possible association between the exposure to organophosphates pesticides (OP) and the induction of insulin resistance (**Montgomery et al., 2008; Raafat et al., 2012; Saldana et al., 2009**). The OP have been considered as the most important environmental contaminants, because these are widely used around the world to increase agricultural production and to control vector-borne diseases (**Schreinemachers and Tipraqsa, 2012**). In this sense, results from in vivo studies

1
2
3
4
5 have showed that the exposure to some OP such as malathion, acephate, and
6
7 chlorpyrifos could be inductors of insulin resistance (**Hamza et al., 2014; Joshi and**
8
9 **Rajini, 2009; Lasram et al., 2015**). The mechanism linked with the OP exposure and
10
11 the development of insulin resistance has been associated with the disrupt of lipid and
12
13 carbohydrate metabolism lead to the induction of oxidative stress and an exacerbate
14
15 response inflammatory (**Mostafalou and Abdollahi, 2016; Rahimi and Abdollahi,**
16
17 **2007; Rezg et al., 2010**). However, the information is insufficient for another OP such as
18
19 the methamidophos.
20
21
22
23
24
25

26 Methamidophos (MET; O,S-dimethyl phosphoramidothiolate) is an OP widely used in
27
28 the world (**Jeschke, 2016**), it is a pesticide widely used in agriculture in Mexico, (**Rojas-**
29
30 **García et al., 2011; Sánchez-Guerra et al., 2011; Schilmann et al., 2010**). However,
31
32 in another countries the use of MET has been restricted for the sale and use (**USEPA,**
33
34 **2006; UNEP/FAO, 1997**). Oxidative stress has been considered a mechanism through
35
36 which MET exert its toxicity (**Araoud et al., 2014; Lu et al., 2012; Panemangalore and**
37
38 **Bebe, 2000; Ramirez-Vargas et al., 2017**). In this sentence, oxidative stress is a cause
39
40 associated with the induction of insulin resistance (**Evans et al., 2005; Rocha et al.,**
41
42 **2013; Tiganis, 2011**). Therefore, the aim of this study was to evaluate the capacity of
43
44 MET to induce insulin resistance in human liver carcinoma (HepG2) cells.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 **2. Materials and Methods**

56
57

58 **2.1. Chemicals**

59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Methamidophos, technical grade (purity 97.7%, CAS#: 10265-92-6), was purchased
6
7 from Sigma-Aldrich (Seelze, GER) and dissolved in DMSO purity 99.9% (Sigma-Aldrich,
8
9 Fulda, GER), such that the final solvent content was <1 % in the cell cultures.
10
11

12 13 14 **2.2. Cell culture**

15
16
17 The human liver carcinoma (HepG2) cell line was purchased from American Type
18
19 Culture Collection-ATCC (Manassas, VA). HepG2 cells were grown in DMEM medium
20
21 (Invitrogen Inc., Grand Island, NY), supplemented with 10% fetal bovine serum, and
22
23 0.1% antibiotic/antimycotic (10 units penicillin, streptomycin 0.01 mg, 0.025 µg
24
25 amphotericin B). The incubations were performed at 37°C in a humidified atmosphere
26
27 with 5% CO₂. The HepG2 were stabilized for a period of 24 h before each assay.
28
29
30
31

32 33 **2.3. Cytotoxicity assays**

34
35
36 Cell viability was measured by the quantitative colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-
37
38 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). For this
39
40 assay, the cells were seeded at 50,000 cells/mL and cultured in 96-well plates in a final
41
42 volume of 200 µL per well. They were exposed to MET at concentrations of 10, 20, 50,
43
44 175, 250, 350, or 500 mg/L for 48 h or 96 h. After incubation, the MTT assay for cell
45
46 viability was performed as previously described by **(Mosmann, 1983)**. Untreated
47
48 controls (cells with only culture medium) and vehicle controls “0 mg/L” (cells with <1%
49
50 DMSO) were included in each test. The concentrations where the viability was less or
51
52 equal to 80% compared with the vehicle control were considered cytotoxic. Three
53
54 independent experiments were performed in triplicate for each condition.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.4. Glucose uptake assay

The ability of insulin to stimulate glucose uptake in HepG2 cells was determined using the fluorescent D-glucose analog “2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-d-glucose” (2-NBDG) (Life Technologies, Eugene, OR), using the protocol previously described by (Zou et al., 2005) with minor modifications. For this experiment 3×10^5 cell/mL were seeded in 24-well plates in a final volume of 500 μ L per well, and were exposed to MET (10, 20, 50, 175, 250, 350 or 500 mg/L) for 48 h or 96 h. After cells were washed 3 times with PBS. Cells were incubated with or without 100 nM insulin in DMEM (without glucose and phenol red) for 30 min, and 10 μ M of the 2-NBDG was added. Fair estimation of the overall glucose uptake was obtained by quantifying the fluorescence at 465/540 nm using a FACS-Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). A total of 10,000 events were obtained for each tested condition, and the analysis was performed using the FACSDIVA V 6.1.3 software (Becton Dickinson). Each condition was evaluated in duplicate in three independent experiments. In each test, untreated controls and vehicle controls were included. In addition, a model of HepG2 cells with insulin resistance (IR) was established according to the method previously reported (Liu et al., 2015; Qin et al., 2011; Xie et al., 2006), briefly cells were exposed at 10^{-6} mol/L insulin for 24 h. For subsequent experiments related with the stimulation insulin, the IR model was used with a control.

2.5. Glucose consumption assay

1
2
3
4
5 The glucose consumption stimulated by insulin in HepG2 cells was determined using the
6 conditions reported by **(Wang et al., 2016)**, with minor modifications. Briefly, for this
7 experiment 3×10^5 cell/mL were seeded in 24-well plates in a final volume of 500 μ L per
8 well. They were exposed to MET (10, 20, 50, 175, 250, 350, or 500 mg/L) for 48 h or 96
9 h. The medium was then replaced with DMEM (free fetal bovine serum) without or with
10 100 nM of insulin and incubated for 24 h. Glucose levels in the culture medium
11 supernatant were measured with a commercially available kit (Spinreact, S.A.), following
12 the instructions of the manufactures. Glucose consumption was determined from the
13 difference between in glucose concentration of cells exposed to MET and cells control.
14 Each condition was evaluated in triplicate in three independent experiments.

30 31 **2.6. Glucose production assay**

32
33
34 The glucose production stimulated by the exposure to MET in HepG2 cells was
35 determined using the conditions reported by **(Cordero-Herrera et al., 2014)**, with minor
36 modifications. Briefly, for this experiment 3×10^5 cell/mL were seeded in 24-well plates
37 with a final volume of 500 μ L per well. They were exposed to MET (10, 20, 50, 175, 250,
38 350, or 500 mg/L) for 6h. After the cells were washed with PBS, then the medium was
39 replaced with DMEM (without phenol red and glucose-free) supplemented with 20 mM of
40 sodium lactate, and 2 mM of sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After 3 h
41 of incubation, the supernatant was collected and the concentration of glucose was
42 measured with Glucose (GO) Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), following the
43 instructions of the manufactures. Glucose concentration was normalized with the protein
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 concentration for each condition assayed. Each condition was evaluated by triplicate in
6
7 three independent experiments.
8
9

10 11 **2.7. Glycogen content assay** 12 13

14
15 The glycogen content was assessed using the reactive “Anthrone” (Sigma-Aldrich
16
17 Germ), as previously described by (Yan et al., 2016), with minor modifications. For this
18
19 assay, HepG2 cells were seeded at 3×10^6 cells/mL (in p60-dish plates in a final volume
20
21 of 3 000 μ L) them were exposed to 10, 20, 50, 175, 250, 350 or 500 mg/L of MET for 6
22
23 h. The medium was removed, and the cells were washed 3 times with PBS. The cells
24
25 were recovered, and 500 mL of KOH at 30% (w/v in distilled water) was added, followed
26
27 by the incubation in a boiling water bath for 20 minutes, then the samples were cooled
28
29 and centrifuged at 12000 g for 15 min, the supernatant was discarded, and 1.5 mL of
30
31 ethyl alcohol (at 96% of purity) were added. This mixture was centrifuged at 12000 g for
32
33 15 min, the supernatant was discarded and the samples were incubated for 1h at 55°C.
34
35 The precipitates were dissolved with 500 μ L of ultrapure distilled water, and 1 mL of
36
37 anthrone reactive (0.2% w/v in 99% H₂SO₄) was added at each tube. The tubes were
38
39 incubated in a boiling water bath for 20 minutes. The absorbance at 620 nm was
40
41 determined using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific,
42
43 Atlanta, GA). The concentration of glycogen was determined from a standard curve.
44
45 Each condition was analyzed in triplicate in two independent experiments. In each test,
46
47 untreated controls (cells with only culture medium) and vehicle controls (cells with <1%
48
49 DMSO) were included. Glycogen concentration was normalized with the protein
50
51 concentration for each condition assayed.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.8. Intracellular lipid accumulation

The total intracellular lipid content was evaluated by Oil Red O (Sigma Aldrich, Mex) staining using the condition reported by **(Ramírez-Zacarías et al., 1992)**. Briefly, 3×10^5 cell/mL were seeded in 24-well plates in a final volume of 500 μ L per well and exposed to MET (10, 20, 50, 175, 250, 350, or 500 mg/L) for 48 h or 96 h. The cells were washed and fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min. Cells were washed stained with Oil Red O at 0.35% (w/v in 2-Isopropanol) for 1 h. The dye was removed, and the cells were rinsed 4 times with distilled water. Finally, 300 μ L of 2-isopropanol (purity 99.9%) was added to each well. The absorbance at 510 nm was measured after 10 min using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Atlanta, GA). Each condition was evaluated in triplicate in three independent experiments. In addition, a model of HepG2 cells with an increase on lipid levels (Eto) was established according to the previously reported **(Wu et al., 2010)**, briefly cells were exposed at 150 nM of ethanol absolute (purity 100%) for 48 h or 96 h. For this assay the Eto model was used as a positive control.

2.9. Measurement of insulin-stimulated GLUT4 translocation and GLUT2 levels.

GLUT4 translocation in HepG2 cells stimulate with insulin and GLUT2 levels were determined using flow cytometry according to protocol reported by **(Koshy et al., 2010)**. For this assay, 3×10^5 cell/mL were seeded in 24-well plates in a final volume of 500 μ L per well and exposed to MET (250, 350, or 500 mg/L, these concentrations were tested

1
2
3
4
5 because showed the major effect in the insulin resistance biomarkers) for 48 h or 96 h.
6
7 After, exposure the cells were washed with PBS and harvested, then cell were plated at
8
9 in a new 24-well plate and incubated for 2 h. Next, the cells were incubated for 30 min
10
11 with or without 100 nM insulin in DMEM and anti-GLUT4 antibody (1:50, ab65267,
12
13 Abcam) or anti-GLUT2 antibody (1:50, ab85715, Abcam) and DyLight®-488-conjugated
14
15 secondary antibody (1:40, ab96879, Abcam). The cells were fixed with 1% of
16
17 formaldehyde for 20 min and the samples were transferred at tubes and centrifuged at
18
19 120 g for 10 min. the pellet was washed for three-times and re-suspend in 1% of
20
21 formaldehyde. Fair estimation of the overall GLUT4 translocation or GLUT2 levels were
22
23 obtained by quantifying the fluorescence at 493/518 nm using a FACS-Canto II flow
24
25 cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). A total of 10,000 events were obtained for
26
27 each tested condition, and the analysis was performed using the FACSDIVA V 6.1.3
28
29 software (Becton Dickinson).
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **2.9.1. Statistical Analysis:**

39
40
41 The statistical analyses were performed using the statistical package STATA version
42
43 13.0 (College Station, TX). The results are presented as means and standard errors. An
44
45 ANOVA with Dunnett's post-hoc test was used to evaluate the effect of MET on
46
47 cytotoxicity, lipid content, glucose uptake/consumption. Pearson's correlation coefficient
48
49 was calculated to evaluate the dose-effect relationship. The graphs were prepared using
50
51 the GraphPad 7.01 program (La Jolla, CA). P-values <0.05 were considered statistically
52
53 significant.
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 **3. Results**
6

7
8
9 **3.1. Cytotoxicity of methamidophos.**

10
11
12 The exposure to MET not induced a cytotoxic effect in HepG2 cells exposed at 0 to 500
13 mg/L for 48 h or 96 h. As shown in supplementary Figure 1 the cell viability estimated by
14 the MTT assay showed that MET no decreased more than 20% of the cell viability
15 compared with the control vehicle ($p < 0.05$).
16
17
18
19
20
21
22

23 **3.2. Effect of methamidophos on glycogen content**
24

25
26 MET decreased the concentration of glycogen 0.14-, 0.16-, 0.3-, 0.35- or 0.41-fold
27 compared with the vehicle control when the cells were exposed to 20, 50, 175, 250, 350
28 or 500 mg/L for 6 h, respectively. This decrease was dose-dependent ($R^2 = -0.96$,
29 $p < 0.001$) (Figure 1). As shown in Figure 1, a highly significant correlation ($R^2 = -0.93$,
30 $p < 0.001$) was founded between glucose production and glycogen concentration.
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **3.3. Effect of methamidophos on the glucose production**
41

42
43 MET to concentrations of 50, 175, 250, 350 or 500 mg/L increased glucose production in
44 the HepG2 as shown in the Figure1. The increases compared with the vehicle control
45 were 2.3-, 3.1-, 3.3-, 3.7- and 4-fold, respectively; the increase was dose-dependent
46 ($R^2 = 0.92$, $p < 0.01$).
47
48
49
50
51
52
53

54 **3.4. Effect of methamidophos on the glucose uptake.**
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 MET decreased the glucose uptake stimulated by the insulin in HepG2 cells exposed by
6
7 48 h or 96 h. The reduction on glucose uptake compared with the vehicle control were
8
9 from 33.5 to 77% in cells exposed by 48 h ($R^2=-0.83$, $p=0.01$) (Figure 2a). For cells
10
11 exposed by 96 h the reduction in glucose uptake compared with the control were from
12
13 57.2% to 86.5% ($R^2=-0.8$, $p<0.01$) (Figure 2b). There was no difference between the
14
15 glucose uptake levels in the cells not stimulated with insulin for both assays.
16
17
18
19
20

21 **3.5. Effect of methamidophos on the glucose consumption.**

22
23

24 MET decreased the glucose consumption induced by insulin. The cells exposed to MET
25
26 (10 - 500 mg/L) by 48 h or 96 h, showed a less capacity in glucose consumption induced
27
28 by insulin compared with the vehicle control (Figure 3).
29
30
31
32

33 **3.6. Effect of methamidophos on intracellular lipid content**

34
35

36 MET increased the intracellular lipid content in HepG2 cells. MET concentrations of 10 -
37
38 500 mg/L for 48 h and 96 h increased the intracellular lipid content, this increase was in
39
40 a dose dependent manner ($R^2=0.84$, $p<0.01$ for 48 h and $R^2=0.93$, $p<0.001$ for 96 h,
41
42 respectively) (Figure 4).
43
44
45
46

47 **3.7. Effect of methamidophos on GLUT4 translocation and GLUT2 levels**

48
49

50 The exposure to MET for 48 h or 96 h at concentrations of 250, 350 or 500 mg/L
51
52 decreased the GLUT4 translocation to cell membrane induced by insulin (Figure 5). An
53
54 increase in GLUT4 levels was founded in the membrane of cells stimulated with insulin
55
56 (2-fold) compared with the unstimulated vehicle control without insulin stimulation. The
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 cells exposed to 250- or 350-mg/L of MET showed a less translocation of GLUT4 (1.6-
6 or 1.5-fold, respectively), compared with unstimulated control. While that, when the cells
7 exposed to MET are compared with insulin stimulated vehicle we observed that MET
8 decreased gradually the GLUT4 translocation to 48 h ($R^2=0.99$, $p<0.01$) (Figure 5a). The
9 reduction in the ability to respond to insulin for increase the GLUT4 translocation was
10 higher in the cells exposed to MET for 96 h in comparison with stimulated control (Figure
11 5b). This reduction was dose-dependent ($R^2=-0.99$, $p<0.01$). The levels of GLUT2 were
12 decreased in HepG2 cells exposed to MET (350 or 500 mg/L) by 96 h. Non-significant
13 changes in GLUT2 levels were observed in HepG2 cells exposed by 48 h to MET. In
14 addition, there were no significant differences between the GLUT2 levels in HepG2 cells
15 stimulated with insulin and unstimulated cells. Figure 6
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 4. Discussion

38
39
40 Insulin resistance is the tissue incapacity to respond at the biological effects induced by
41 insulin stimulation; this condition lead to impaired glucose metabolism, with an increase
42 of free fatty acid levels (**Barazzoni et al., 2018**). The causes of this metabolic condition
43 are associated with several risk factors such as lifestyle (**Peplies et al., 2016**), genetic
44 background (**Scott et al., 2014**), obesity (**Jung et al., 2018**) and western diet (**Aroor et**
45 **al., 2015**). However, recent studies have been shown that the exposure to
46 environmental pollutants like to OP could be a risk factor involved in the development of
47 insulin resistance (**Hectors et al., 2013**; **Mostafalou, 2016**). In this study, we
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 investigated whether MET, an OP, can disrupt the glycogen and lipid contents, and the
6 production/uptake/consumption of glucose, as well as the GLUT2 levels and the GLUT4
7 translocation induced by insulin in HepG2 cells. The results showed that MET decreased
8 glycogen levels, consumption/uptake of glucose, GLUT4 translocation and GLUT2
9 levels. In addition, MET increased the lipid content and glucose production. The data
10 obtained in this study suggesting that the exposure to MET induced insulin resistance in
11 HepG2 cells.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Reduction of hepatic glycogen levels with subsequent hyperglycemia are early
24 biomarkers frequently observed during the IR (**Roden, 2008**). In this study was observed
25 that MET increased the production of glucose, this event was associated with the
26 reduction in glycogen levels in HepG2. The high correlation between these parameters
27 suggesting that the exposure to MET induced the glycogenolysis with subsequent
28 glucose liberation (**Sharabi et al., 2015**). In animals models exposed to malathion,
29 another OP was observed the increased in the blood glucose concentration attributed to
30 enhanced hepatic glucose production by the over-stimulation of enzymes implicated in
31 glycogenolysis (such as glycogen phosphorylase) or in neo-glycogenesis (such as
32 phosphofruktokinase) in the liver (**Abdollahi et al., 2004; Basiri et al., 2007**). These
33 observations suggest that the OP could be an inductors of enzymes implicated in
34 glycogenolysis; it could be the cause for the reduction in hepatic glycogen levels and
35 increase on the blood glucose liberation. However, further studies focused on describing
36 the mechanisms of glucose production induced by exposure to MET must be performed.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Recently, **Irimia et al., (2017)** had reported that the reduction in glycogen content in the
6
7 liver could play a key role such as a negative regulator of the insulin pathway. The
8
9 authors observed that the reduction in hepatic glycogen levels lead to the increase in the
10
11 activity, protein levels, and expression of several genes involved into *de novo* fatty acid
12
13 synthesis. The exacerbate increase of lipid content decreases the fatty acid oxidation in
14
15 the hepatocytes, these processes lead to increased lipid content (hepatic steatosis) and
16
17 ectopic fat accumulation that triggers the insulin resistance (**Irimia et al., 2017**).
18
19
20
21
22

23 The glucose uptake/consumption is considerate as the end step in PI3k-Akt pathway
24
25 activated by insulin (**White, 2003**). Impaired insulin cell pathway is associated with a
26
27 negative regulation in the PI3K-Akt pathway that leads to reduction in the
28
29 consumption/uptake of glucose (Cartee, 2015). The exposure to MET decreased the
30
31 insulin-stimulated glucose uptake. A mechanism associated with negative regulation is
32
33 the activation of serine kinases such as c-Jun N-terminal kinase (JNK). This MAP kinase
34
35 is capable of inactivate the insulin receptor substrate (IRS) by increased in serine
36
37 phosphorylation lead to IRS degradation (**Lee et al., 2003**). Several studies have
38
39 showed the capacity of another OP for enhance the JNK activity (**Batista et al., 2016**;
40
41 **Caughlan et al., 2004**; **Liu et al., 2010**; **Shen and Liu, 2006**); this effect is associated
42
43 with development of an inflammatory response or by the induction of oxidative stress (**Ki**
44
45 **et al., 2013**). In this regard, MET increased the expression of pro-inflammatory cytokines
46
47 such as TNF- α in neuroblastoma cells (**Li et al., 2012**), and induced oxidative stress in
48
49 peripheral blood mononuclear cells (**Ramirez-Vargas et al., 2017**) and PC12 cells (**Lu**
50
51 **et al., 2012**). This data suggesting that the reduction on glucose uptake stimulated by
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 insulin in HepG2 cells exposed to MET could be attributed at the activation of JNK
6
7 through of the induction of oxidative stress. Additional studies focused on determining
8
9 the role of JNK and oxidative stress in insulin resistance induction by MET are
10
11 necessary.
12
13

14
15
16 The over-accumulation of lipids in the liver is considerate as a frequent pathological
17
18 condition linked to IR (**Schleicher et al., 2014**). The results obtained in this study
19
20 showed that the exposure to MET (10 – 500 mg/L) increased the lipid content in HepG2
21
22 cells compared with the vehicle control in a dose-time dependent manner. In vitro
23
24 exposure of McA-RH7777 hepatoma cells to chlorpyrifos another OP, showed an
25
26 increase in the lipid content respect to control cells. This increase was associated with
27
28 enhanced of *de novo* lipid synthesis, and a decreased of triglyceride secretion (**Howell**
29
30 **et al., 2016**). In addition, the chlorpyrifos oxon is capable of decreased the lipase activity
31
32 leads to increase in diacylglycerol levels (**Bomser et al., 2002**). These observations
33
34 suggest that the mechanism linked to increase of lipid content by exposure to MET could
35
36 be the induction of *de novo* lipogenesis, or the inhibition of lipase activity in these cells.
37
38 However, the perturbation on metabolism of lipids induced by MET have not been
39
40 characterized, more studies are necessary for establishing the mechanism associated
41
42 with the increases of lipid content in response to MET exposure.
43
44
45
46
47
48
49

50
51 The increase of lipid content in cells are associate with the enhance activity of Protein
52
53 kinase C (PKC), a serine kinase, leading to increase in serine phosphorylation in IRS,
54
55 and a decrease in the activity de PI3K-Akt pathway with a subsequent reduction of
56
57 glucose uptake stimulate by insulin (**Mittra et al., 2008**). The results obtained in this
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 study showed that MET induced a reduction on glucose consumption stimulated by
6
7 insulin in HepG2 cells. This reduction was dose-time-dependent manner. Unexpectedly,
8
9 an increase of the glucose consumption in the cells exposed to MET without stimulation
10
11 with insulin was observed. This effect could be attributed a high energetic need that is
12
13 required for support the activity of the CYP450 during the OP metabolism (**Drăgan**
14
15 **Călin-Aurel et al., 2006; Lukaszewicz-Hussain, 2010**).
16
17
18
19
20

21 After insulin stimulation, there is a turn on of pathways that lead to the intracellular
22
23 GLUT4-containing vesicles to translocate this protein to the cell surface. For this reason,
24
25 the incapacity of the translocation of GLUT4 in cells under insulin stimulation is a widely
26
27 observed biomarker of insulin resistance state (**Hectors et al., 2013**). The results
28
29 obtained show that MET is capable to decrease insulin-stimulated GLUT 4 translocation
30
31 in HepG2 suggesting that MET induces insulin resistance in these cells. This reduction
32
33 in insulin-stimulated GLUT4 translocation could be due to increases in expression of
34
35 CYP450 that are induced by MET at concentration similar to those tested in this study
36
37 (500 µg/mL) (**Li et al., 2012**). In this regard, the increase in the expression of CYP450
38
39 (isoform CYP2E1) in skeletal muscle-derived L6 cells lead to the inhibition insulin-
40
41 stimulated GLUT4 translocation with the subsequent reduction in the insulin-stimulated
42
43 glucose uptake. The authors suggest that there is a negative and ROS-dependent
44
45 relation between the increase of expression of CYP450 and the insulin-stimulated
46
47 GLUT4 translocation. The molecular mechanism was linked to over activation of
48
49 transcription factor NF-E2-related factor 2 (NRF2) in respond to increase in ROS levels.
50
51 The inhibition of ROS (by antioxidant such as vitamin E or N-acetyl-1-cysteine) or
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 CYP2E1 (by chlormethiazole a CYP2E1-specific inhibitor) protects the cells of inhibition
6
7 insulin-stimulated GLUT4 translocation (**Armoni et al., 2014**). More studies are
8
9 necessary to elucidate the role of oxidative stress and CYP450 expression in the insulin
10
11 resistance induced by the exposure to MET.
12
13
14

15
16 Results obtained in this study showed that the exposure to MET decrease levels of
17
18 GLUT2 in HepG2 cells when it was exposed at 96 h. The results reported by
19
20 **Aravinthan et al., (2015)** showed that the reduction in protein and RNAm levels from
21
22 GLUT2 is a characteristic of hepatocytes with insulin resistance. These results were
23
24 reported an *in vitro* model (HepG2 cells with insulin resistance), and patients with
25
26 cirrhotic liver, or steatohepatitis, or alcohol-related hepatitis.
27
28
29
30

31
32 Incapacity activated Akt for inducing the phosphorylation of Nuclear forkhead box protein
33
34 O1 (FoxO1) in response to insulin has showed in insulin-resistant HepG2 cells
35
36 (**Aravinthan et al., 2015**). The phosphorylation of FoXO1, this event lead to nuclear
37
38 exclusion of FoXO1 and their cytosolic sequestration (**Accili and Arden, 2004**). The
39
40 non-inhibition of FoxO1 could be a mechanism linked to the decrease in GLUT2 levels,
41
42 because FoxO1 suppress the pancreatic duodenal homeobox 1 (Pdx1) resulting in a
43
44 negative regulation of GLUT2 transcription (**Song et al., 2016**). More studies are
45
46 necessary for evidentiary the role of FoxO1 in the insulin resistance induced by the
47
48 exposure to MET must be performed.
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 **Conclusions**

59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9 The data obtained in this study suggest that MET is capable increased the lipid content
10 and glucose production in HepG2 cells, and significantly decreased the glucose
11 uptake/consumption stimulated by insulin with the decrease in glycogen contents. In
12 addition, decreased in GLUT4 translocation and GLUT2 levels, both stimulated by
13 insulin, are consistent with the induction of insulin resistance on HepG2 cells. However,
14 additional studies focused on determining the effects of MET on the main molecular
15 targets of PI3K-Akt in response to insulin are necessary.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 **Legends**

31
32
33
34 **Figure S1.** Effect of MET on HepG2 viability. HepG2 cells were incubated with various
35 concentrations of MET for 48 or 96 h, and the cell viability (%) was determined using the
36 MTT assay. The dotted line indicates a 20% decrease in cell viability. The data
37 represent the mean and standard error of three independent experiments. *Significant
38 difference ($p < 0.05$) between the cells exposed to MET and the vehicle control “0 mg/L”.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50
51 **Figure 1.** Effect of MET on glucose production and glycogen content. HepG2 cells were
52 exposed to various concentrations of MET for 6 h. The mean and standard error from
53 three independent experiments are presented. *Significant difference between the
54 vehicle control “0 mg/L” and the MET-treated cells ($p < 0.05$).
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9 **Figure 2.** Effect of MET on glucose uptake in HepG2. HepG2 cells were treated with
10 various concentrations of MET for 48 h (a) or 96 h (b). Glucose uptake was determined
11 with 2-NBDG assay. The basal and insulin stimulated glucose uptake were measured
12
13
14 IR: HepG2 cells with insulin resistance. The data represent the mean and standard error
15
16 of three independent experiments. *Significant difference ($p<0.05$) between the cells
17
18 exposed to MET and the vehicle control "0 mg/L".
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 **Figure 3.** Effect of MET on glucose consumptions in HepG2. HepG2 were treated with
29 various concentrations of MET for 48 h (a) or 96 h (b). The basal and insulin stimulated
30 glucose consumptions were measured. IR: HepG2 cells with insulin resistance. The data
31 represent the mean and standard error of three independent experiments. *Significant
32
33 difference ($p<0.05$) between the cells exposed to MET and the vehicle control "0 mg/L".
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 **Figure 4.** Effect of MET on intracellular lipid content. HepG2 cells were incubated with
45 various concentrations of MET for 48 h or 96 h. Oil Red O staining was used for
46 determined the intracellular lipid accumulation. Eto: HepG2 cells exposed to 150 nM of
47 ethanol. The data represent the mean and standard error of three independent
48
49 experiments. *Significant difference ($p<0.05$) between the cells exposed to MET and the
50
51 vehicle control "0 mg/L".
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9 **Figure 5.** Effect of MET on GLUT4 translocation in HepG2. HepG2 cells were incubated
10 with various concentrations of MET for 48 h (a) or 96 h (b). The levels of GLUT4 in cell
11 membrane were determined. The data represent the mean and standard error of two
12 independent experiments. Significant difference * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$),
13 ****($p < 0.0001$) between the cells exposed to MET and the vehicle control “0 mg/L”.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Figure 6.** Effect of MET on GLUT2 levels in HepG2. HepG2 cells were incubated with
26 various concentrations of MET for 48 h (a) or 96 h (b). The levels of GLUT2 in cell
27 membrane were determined. The data represent the mean and standard error of two
28 independent experiments. . Significant difference * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$),
29 ****($p < 0.0001$) between the cells exposed to MET and the vehicle control “0 mg/L”.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **Acknowledgments:** This work was partially supported by Red Temática de Toxicología
43 de Plaguicidas (CONACYT-253789/271775), and PFCE-UAGro 2016. RVMA was
44 awarded a grant by the CONACYT-Mexico (#276990).
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 **Conflicts of Interest:** “The authors declare no conflict of interest of any type”.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 **References**
6

7
8
9 Abdollahi, M., Donyavi, M., Pournourmohammadi, S., Saadat, M., 2004. Hyperglycemia
10 associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate
11 carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem.*
12 *Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 137, 343–347.
13
14
15
16
17

18
19 Accili, D., Arden, K.C., 2004. FoxOs at the Crossroads of Cellular Metabolism,
20 Differentiation, and Transformation. *Cell* 117, 421–426. [https://doi.org/10.1016/S0092-](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00452-0)
21 [8674\(04\)00452-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00452-0)
22
23
24
25

26
27 Araoud, M., Neffeti, F., Douki, W., Khaled, L., Najjar, M.F., Kenani, A., Houas, Z., 2014.
28 Toxic effects of methamidophos on paraoxonase 1 activity and on rat kidney and liver
29 and ameliorating effects of alpha-tocopherol. *Environ. Toxicol.*
30 <https://doi.org/10.1002/tox.22095>
31
32
33
34
35

36
37 Aravinthan, A., Challis, B., Shannon, N., Hoare, M., Heaney, J., Alexander, G.J.M.,
38 2015. Selective insulin resistance in hepatocyte senescence. *Exp. Cell Res.* 331, 38–45.
39 <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.025>
40
41
42
43
44

45
46 Armoni, M., Harel, C., Ramdas, M., Karnieli, E., 2014. CYP2E1 Impairs GLUT4 Gene
47 Expression and Function: NRF2 as a Possible Mediator. *Horm. Metab. Res.* 46, 477–
48 483. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363990>
49
50
51
52

53
54 Aroor, A.R., Habibi, J., Ford, D.A., Nistala, R., Lastra, G., Manrique, C., Dunham, M.M.,
55 Ford, K.D., Thyfault, J.P., Parks, E.J., 2015. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibition
56 Ameliorates Western Diet–Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance Through
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Hepatic Lipid Remodeling and Modulation of Hepatic Mitochondrial Function. *Diabetes*
6
7 64, 1988–2001.
8
9

10 Barazzoni, R., Cappellari, G.G., Ragni, M., Nisoli, E., 2018. Insulin resistance in obesity:
11
12 an overview of fundamental alterations. *Eat. Weight Disord. - Stud. Anorex. Bulim.*
13
14 *Obes.* 1–9. <https://doi.org/10.1007/s40519-018-0481-6>
15
16
17

18 Basiri, S., Esmaily, H., Vosough-Ghanbari, S., Mohammadirad, A., Yasa, N., Abdollahi,
19
20 M., 2007. Improvement by *Satureja khuzestanica* essential oil of malathion-induced red
21
22 blood cells acetylcholinesterase inhibition and altered hepatic mitochondrial glycogen
23
24 phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *Pestic. Biochem.*
25
26 *Physiol.* 89, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.04.006>
27
28
29

30
31
32 Batista, J.E.S., Sousa, L.R., Martins, I.K., Rodrigues, N.R., Posser, T., Franco, J.L.,
33
34 2016. Data on the phosphorylation of p38MAPK and JNK induced by chlorpyrifos in
35
36 *Drosophila melanogaster*. *Data Brief* 9, 32–34.
37
38

39 Birkenfeld, A.L., Shulman, G.I., 2014. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin
40
41 resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology* 59, 713–723.
42
43 <https://doi.org/10.1002/hep.26672>
44
45
46

47 Bomser, J.A., Quistad, G.B., Casida, J.E., 2002. Chlorpyrifos oxon potentiates
48
49 diacylglycerol-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK 44/42) activation,
50
51 possibly by diacylglycerol lipase inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 178, 29–36.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Cartee, G.D., 2015. Mechanisms for greater insulin-stimulated glucose uptake in normal
6 and insulin-resistant skeletal muscle after acute exercise. *Am. J. Physiol.-Endocrinol.*
7
8 *Metab.* 309, E949–E959.
9

10
11
12
13 Caughlan, A., Newhouse, K., Namgung, U., Xia, Z., 2004. Chlorpyrifos Induces
14 Apoptosis in Rat Cortical Neurons that is Regulated by a Balance Between p38 and
15 ERK/JNK MAP Kinases. *Toxicol. Sci.* 78, 125–134. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh038>
16
17
18

19
20
21 Cordero-Herrera, I., Martín, M.Á., Goya, L., Ramos, S., 2014. Cocoa flavonoids
22 attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake
23 and production in human HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 64, 10–19.
24
25
26
27 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.014>
28
29

30
31
32 Drăgan Călin- Aurel, Blank Lars M., Bureik Matthias, 2006. Increased TCA cycle activity
33 and reduced oxygen consumption during cytochrome P450- dependent
34 biotransformation in fission yeast. *Yeast* 23, 779–794. <https://doi.org/10.1002/yea.1383>
35
36
37

38
39
40 Evans, J.L., Maddux, B.A., Goldfine, I.D., 2005. The molecular basis for oxidative stress-
41 induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1040–1052.
42
43

44
45 Hamza, R.Z., Diab, A.E.A., El-Aziz, E.-S.A.A., 2014. Hyperglycemic effect of
46 Chlorpyrifos, Profenofos and possible ameliorative role of Propolis and ginseng. *Scientia*
47
48 1, 9–14.
49
50

51
52
53 Hectors, T.L.M., Vanparys, C., Van Gaal, L.F., Jorens, P.G., Covaci, A., Blust, R., 2013.
54
55
56 Insulin resistance and environmental pollutants: experimental evidence and future
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 perspectives. Environ. Health Perspect. 121, 1273–1281.

6
7
8 <https://doi.org/10.1289/ehp.1307082>

9
10
11 Howell, G.E., Mulligan, C., Young, D., Kondakala, S., 2016. Exposure to chlorpyrifos
12 increases neutral lipid accumulation with accompanying increased de novo lipogenesis
13 and decreased triglyceride secretion in McArdle-RH7777 hepatoma cells. Toxicol. Vitro
14 Int. J. Publ. Assoc. BIBRA 32, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.002>

15
16
17
18 Irimia, J.M., Meyer, C.M., Segvich, D.M., Surendran, S., DePaoli-Roach, A.A., Morral,
19 N., Roach, P.J., 2017. Lack of liver glycogen causes hepatic insulin resistance and
20 Steatosis in mice. J. Biol. Chem. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.786525>

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
Jeschke, P., 2016. Propesticides and their use as agrochemicals. Pest Manag. Sci. 72,
210–225. <https://doi.org/10.1002/ps.4170>

Joshi, A.K.R., Rajini, P.S., 2009. Reversible hyperglycemia in rats following acute
exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: role of gluconeogenesis.
Toxicology 257, 40–45.

Jung, S.-H., Jung, C.-H., Reaven, G.M., Kim, S.H., 2018. Adapting to insulin resistance
in obesity: role of insulin secretion and clearance. Diabetologia 61, 681–687.
<https://doi.org/10.1007/s00125-017-4511-0>

Ki, Y.-W., Park, J.H., Lee, J.E., Shin, I.C., Koh, H.C., 2013. JNK and p38 MAPK regulate
oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis.
Toxicol. Lett. 218, 235–245.

1
2
3
4
5 Koshy, S., Alizadeh, P., Timchenko, L.T., Beeton, C., 2010. Quantitative measurement
6 of GLUT4 translocation to the plasma membrane by flow cytometry. *J. Vis. Exp. JoVE*.
7
8

9
10 <https://doi.org/10.3791/2429>
11

12
13 Lasram, M.M., Bouzid, K., Douib, I.B., Annabi, A., El Elj, N., El Fazaa, S., Abdelmoula,
14 J., Gharbi, N., 2015. Lipid metabolism disturbances contribute to insulin resistance and
15 decrease insulin sensitivity by malathion exposure in Wistar rat. *Drug Chem. Toxicol.* 38,
16
17
18

19 227–234. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.933348>
20
21

22
23 Lee, Y.H., Giraud, J., Davis, R.J., White, M.F., 2003. c-Jun N-terminal kinase (JNK)
24 mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 278, 2896–
25
26
27

28 2902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208359200>
29
30

31
32 LeRoith, D., Accili, D., 2008. Mechanisms of Disease: using genetically altered mice to
33 study concepts of type 2 diabetes. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4, 164–172.
34
35

36 <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0729>
37
38

39
40 Li, T., Zhao, H., Hung, G.-C., Han, J., Tsai, S., Li, B., Zhang, J., Puri, R.K., Lo, S.-C.,
41 2012. Differentially expressed genes and pathways induced by organophosphates in
42 human neuroblastoma cells. *Exp. Biol. Med.* 237, 1413–1423.
43
44

45 <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012178>
46
47

48
49
50 Liu, H., Liu, J., Xu, L., Zhou, S., Li, L., Liu, W., 2010. Enantioselective cytotoxicity of
51 isocarbophos is mediated by oxidative stress-induced JNK activation in human
52 hepatocytes. *Toxicology* 276, 115–121.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Liu, Z.-Q., Liu, T., Chen, C., Li, M.-Y., Wang, Z.-Y., Chen, R.-S., Wei, G.-X., Wang, X.-
6 Y., Luo, D.-Q., 2015. Fumosorinone, a novel PTP1B inhibitor, activates insulin signaling
7 in insulin-resistance HepG2 cells and shows anti-diabetic effect in diabetic KKAY mice.
8 Toxicol. Appl. Pharmacol. 285, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.03.011>
9

10
11
12
13
14
15 Lu, X.T., Ma, Y., Wang, C., Zhang, X.F., Jin, D.Q., Huang, C.J., 2012. Cytotoxicity and
16 DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12
17 cells and protection by vitamin E. J. Environ. Sci. Health B 47, 445–454.
18 <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.663312>
19
20
21
22

23
24
25
26 Lukaszewicz-Hussain, A., 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide
27 toxicity – Short review. Pestic. Biochem. Physiol. 98, 145–150.
28 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.006>
29
30
31
32

33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Mittra, S., Bansal, V.S., Bhatnagar, P.K., 2008. From a glucocentric to a lipocentric
approach towards metabolic syndrome. Drug Discov. Today 13, 211–218.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.01.006>

Montgomery, M.P., Kamel, F., Saldana, T.M., Alavanja, M.C.R., Sandler, D.P., 2008.
Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators:
Agricultural Health Study, 1993–2003. Am. J. Epidemiol. 167, 1235–1246.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application
to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63.

1
2
3
4
5 Mostafalou, S., 2016. Persistent Organic Pollutants and Concern Over the Link with
6
7 Insulin Resistance Related Metabolic Diseases. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 238,
8
9 69–89. https://doi.org/10.1007/398_2015_5001
10
11

12
13 Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2016. Pesticides: an update of human exposure and
14
15 toxicity. *Arch. Toxicol.* 1–51. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
16
17

18
19 Panemangalore, M., Bebe, F.N., 2000. Dermal exposure to pesticides modifies
20
21 antioxidant enzymes in tissues of rats. *J. Environ. Sci. Health Part B* 35, 399–416.
22
23 <https://doi.org/10.1080/03601230009373279>
24
25

26
27 Peplies, J., Börnhorst, C., Günther, K., Fraterman, A., Russo, P., Veidebaum, T.,
28
29 Tornaritis, M., De Henauw, S., Marild, S., Molnar, D., 2016. Longitudinal associations of
30
31 lifestyle factors and weight status with insulin resistance (HOMA-IR) in preadolescent
32
33 children: the large prospective cohort study IDEFICS. *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.* 13,
34
35 97.
36
37

38
39
40 Qin, N., Li, C.-B., Jin, M.-N., Shi, L.-H., Duan, H.-Q., Niu, W.-Y., 2011. Synthesis and
41
42 biological activity of novel tiliroside derivants. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 5189–5195.
43
44 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.059>
45
46

47
48 Raafat, N., Abass, M.A., Salem, H.M., 2012. Malathion exposure and insulin resistance
49
50 among a group of farmers in Al-Sharkia governorate. *Clin. Biochem.* 45, 1591–1595.
51
52

53
54 Rahimi, R., Abdollahi, M., 2007. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia
55
56 induced by organophosphorus pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 115–121.
57
58 <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.10.003>
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Ramirez-Vargas, M.A., Huerta-Beristain, G., Guzman-Guzman, I.P., Alarcon-Romero, L.
6
7 del C., Flores-Alfaro, E., Rojas-Garcia, A.E., Moreno-Godinez, M.E., 2017.
8
9 Methamidophos induces cytotoxicity and oxidative stress in human peripheral blood
10
11 mononuclear cells. *Environ. Toxicol.* 32, 147–155. <https://doi.org/10.1002/tox.22220>
12
13
14

15
16 Ramírez-Zacarías, J.L., Castro-Muñozledo, F., Kuri-Harcuch, W., 1992. Quantitation of
17
18 adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O.
19
20 *Histochemistry* 97, 493–497. <https://doi.org/10.1007/BF00316069>
21
22

23
24 Rezg, R., Mornagui, B., El-Fazaa, S., Gharbi, N., 2010. Organophosphorus pesticides
25
26 as food chain contaminants and type 2 diabetes: a review. *Trends Food Sci. Technol.*
27
28 21, 345–357.
29

30
31
32 Rocha, M., Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Bellod, L., Falcon, R., Castello, R., Morillas, C.,
33
34 Herance, J.R., Hernandez-Mijares, A., Victor, V.M., 2013. Mitochondrial dysfunction and
35
36 oxidative stress in insulin resistance. *Curr. Pharm. Des.* 19, 5730–5741.
37
38

39
40 Roden, M., 2008. Hepatic glucose production and insulin resistance. *Wien. Med.*
41
42 *Wochenschr.* 1946 158, 558–561. <https://doi.org/10.1007/s10354-008-0595-y>
43
44

45
46 Rojas-García, A.E., Medina-Díaz, I.M., Robledo-Marenco, M. de L., Barrón-Vivanco,
47
48 B.S., Girón-Pérez, M.I., Velázquez-Fernández, J.B., González-Arias, C.A., Albores-
49
50 Medina, A., Quintanilla-Vega, B., Ostrosky-Wegman, P., Rojas-García, M.C., Pérez-
51
52 Herrera, N.E., López-Flores, J.F., 2011. Hematological, biochemical effects, and self-
53
54 reported symptoms in pesticide retailers. *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup.*
55
56 *Environ. Med.* 53, 517–521. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e318215fbf2>
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Saldana, T.M., Basso, O., Baird, D.D., Hoppin, J.A., Weinberg, C.R., Blair, A., Alavanja,
6 M.C., Sandler, D.P., others, 2009. Pesticide exposure and hypertensive disorders during
7 pregnancy. *Env. Health Perspect* 117, 1393–1396.
8
9

10
11
12
13 Samuel, V.T., Shulman, G.I., 2016. The pathogenesis of insulin resistance: integrating
14 signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest.* 126, 12–22.
15
16
17 <https://doi.org/10.1172/JCI77812>
18
19

20
21 Sánchez-Guerra, M., Pérez-Herrera, N., Quintanilla-Vega, B., 2011.
22 Organophosphorous pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental
23 approaches. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 681–691.
24
25
26
27 <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.602130>
28
29

30
31
32 Schilman, A., Lacasana, M., Blanco-Munoz, J., Aguilar-Garduno, C., Salinas-
33 Rodriguez, A., Flores-Aldana, M., Cebrian, M.E., 2010. Identifying pesticide use patterns
34 among flower growers to assess occupational exposure to mixtures. *Occup. Environ.*
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

51
52
53 Schreinemachers, P., Tipraqsa, P., 2012. Agricultural pesticides and land use
54 intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy* 37, 616–626.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 Scott, R.A., Fall, T., Pasko, D., Barker, A., Sharp, S.J., Arriola, L., Balkau, B., Barricarte,
6
7 A., Barroso, I., Boeing, H., 2014. Common genetic variants highlight the role of insulin
8
9 resistance and body fat distribution in type 2 diabetes, independent of obesity. *Diabetes*
10
11 63, 4378–4387.
12
13

14
15 Sharabi, K., Tavares, C.D.J., Rines, A.K., Puigserver, P., 2015. Molecular
16
17 pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol. Aspects Med., From Glucose to*
18
19 *glycogen and Back: Festschrift in honor of Bill Whelan 90th birthday* 46, 21–33.
20
21 <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.003>
22
23

24
25 Shen, H.-M., Liu, Z., 2006. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death
26
27 mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 928–939.
28
29

30
31 Song, M.-Y., Wang, J., Ka, S.-O., Bae, E.J., Park, B.-H., 2016. Insulin secretion
32
33 impairment in Sirt6 knockout pancreatic β cells is mediated by suppression of the
34
35 FoxO1-Pdx1-Glut2 pathway. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep30321>
36
37

38
39 Tiganis, T., 2011. Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad
40
41 and the ugly. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 82–89.
42
43 <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.11.006>
44
45

46
47 UNEP/FAO. 1997. United Nations Environment Programme/Food and Agriculture
48
49 Organization. Decision Guidance Documents: Methamidophos - Methyl parathion -
50
51 Monocrotophos -Parathion – Phosphamidon. Operation of the PIC procedure for
52
53 pesticides included because of their acute hazard classification and concern as to their
54
55 impact on human health under conditions of use in developing countries. Joint
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

FAO/UNEP programme for the operation of Prior Informed Consent (PIC) (Rome-Geneva) <http://www.fao.org/docrep/w5715e/w5715e02>.

USEPA. 2006. U. S. Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision for Methamidophos. Washinton, DC.

Wang, C., Jiang, J.-D., Wu, W., Kong, W.-J., 2016. The Compound of Mangiferin-Berberine Salt Has Potent Activities in Modulating Lipid and Glucose Metabolisms in HepG2 Cells. *BioMed Res. Int.* 2016, e8753436. <https://doi.org/10.1155/2016/8753436>

White, M.F., 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science* 302, 1710–1711. <https://doi.org/10.1126/science.1092952>

Wu, D., Wang, X., Zhou, R., Cederbaum, A., 2010. CYP2E1 Enhances Ethanol-induced Lipid Accumulation but Impairs Autophagy in HepG2 E47 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.127>

Xie, W., Wang, W., Su, H., Xing, D., Pan, Y., Du, L., 2006. Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 143, 429–435. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.04.002>

Yan, F., Zhang, J., Zhang, L., Zheng, X., 2016. Mulberry anthocyanin extract regulates glucose metabolism by promotion of glycogen synthesis and reduction of gluconeogenesis in human HepG2 cells. *Food Funct.* 7, 425–433. <https://doi.org/10.1039/c5fo00841g>

1
2
3
4
5 Zou, C., Wang, Y., Shen, Z., 2005. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose
6 uptake measurement. J. Biochem. Biophys. Methods 64, 207–215.
7
8
9 <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.08.001>
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 Figure S1
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50
51 Figure 1
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

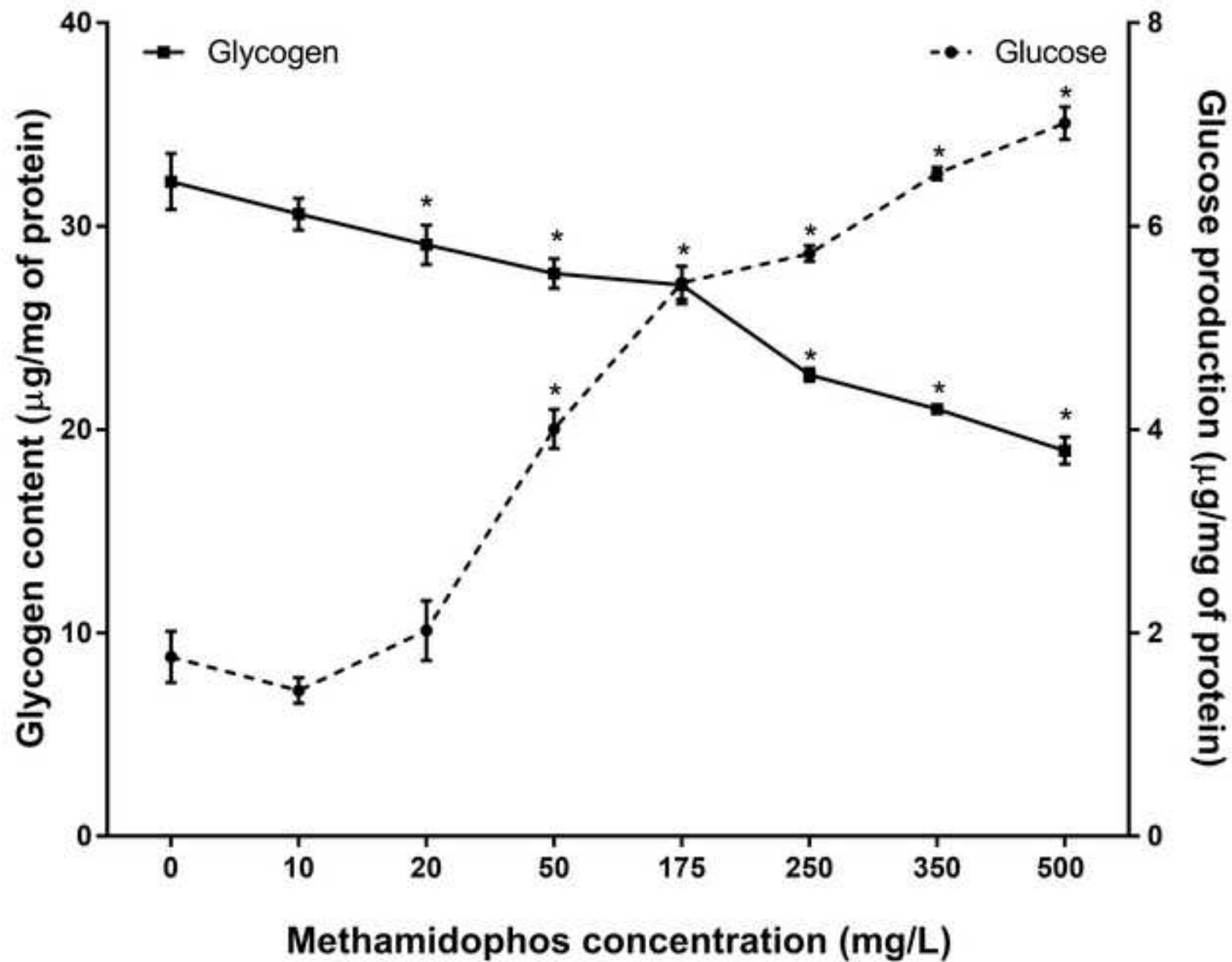


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

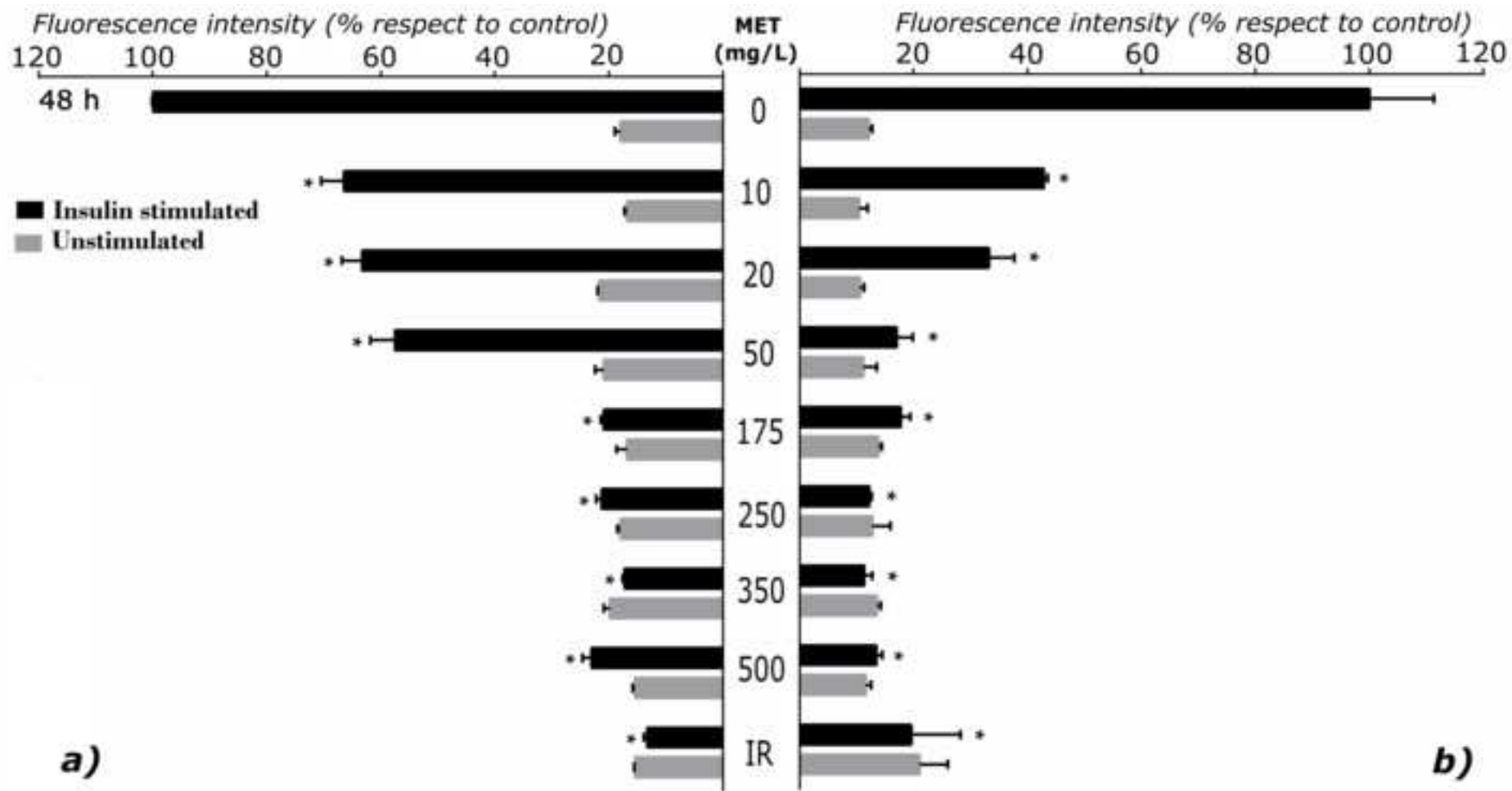


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

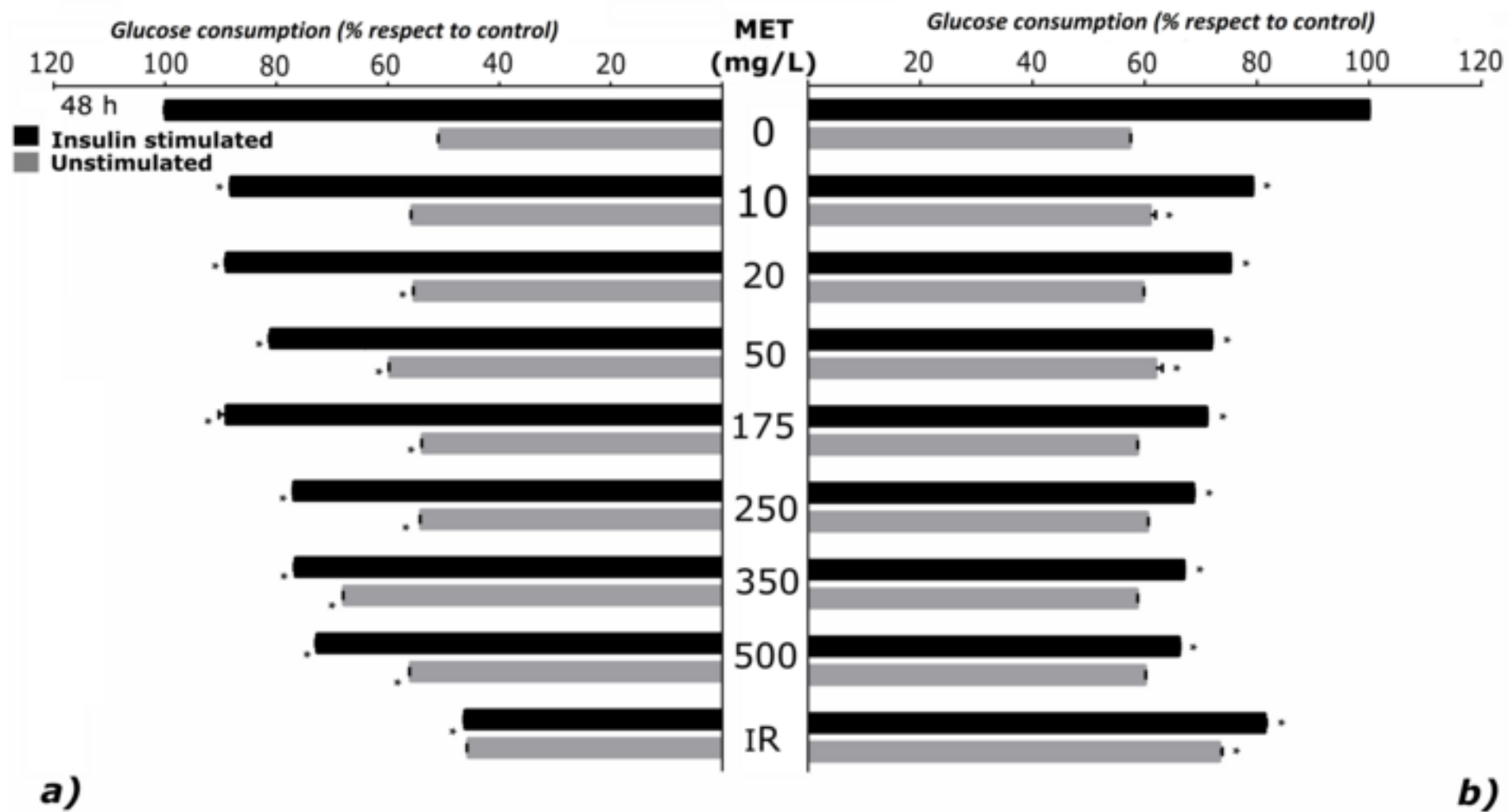


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

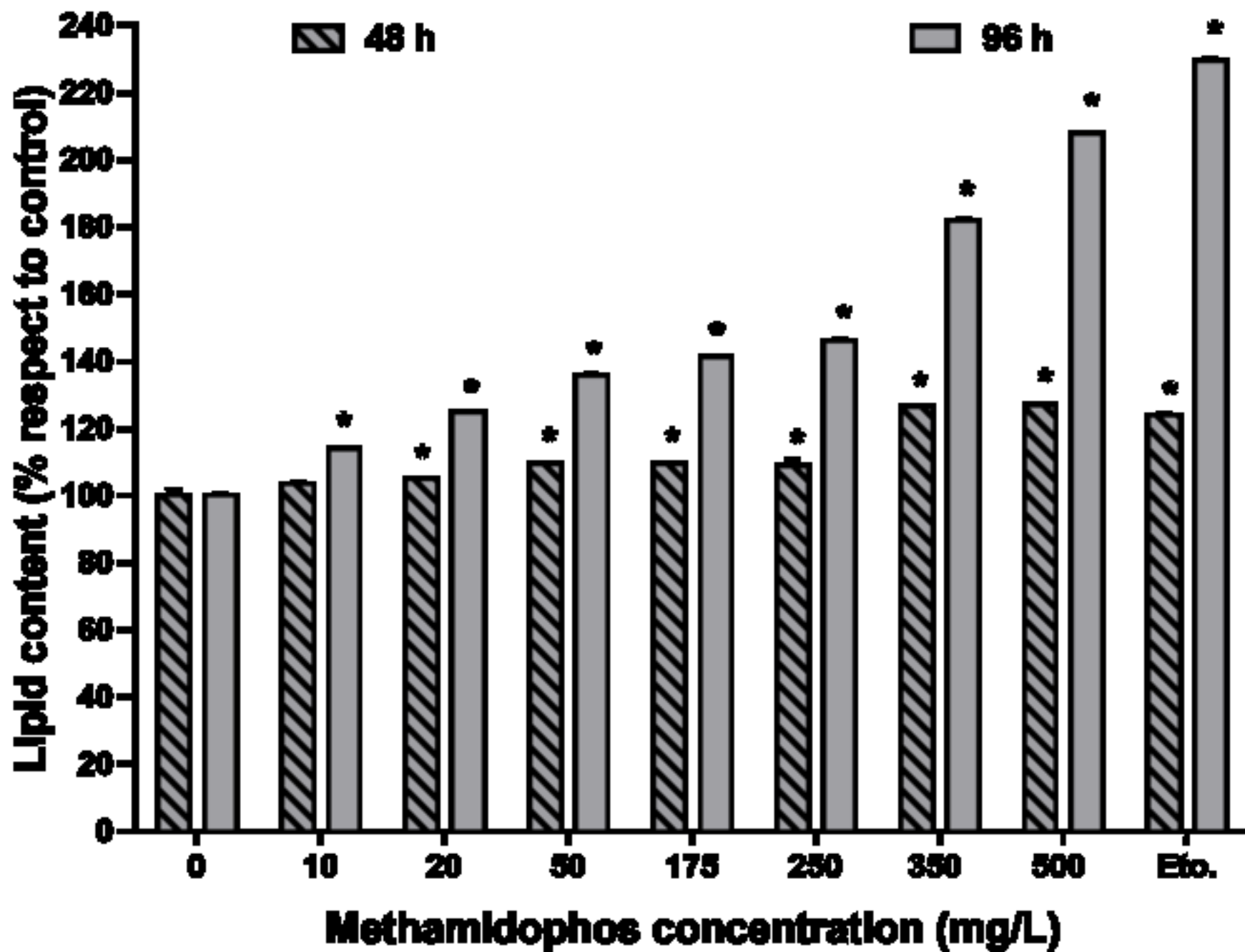


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

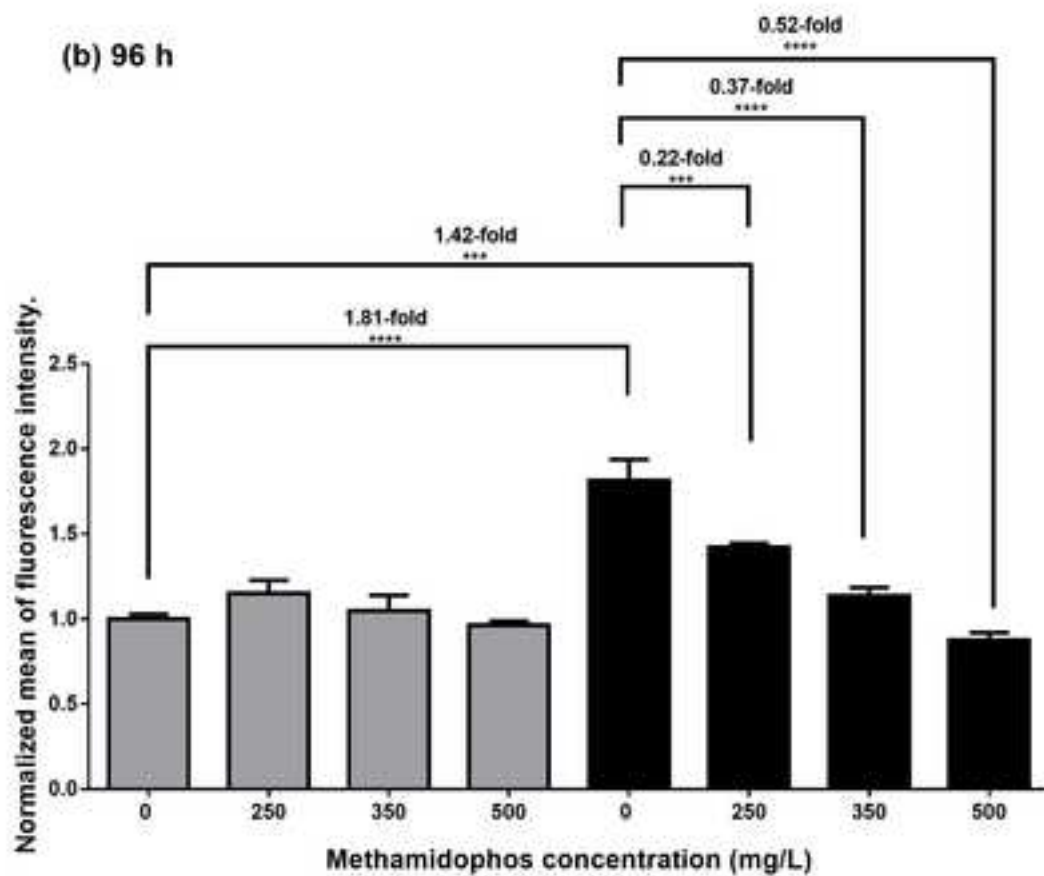
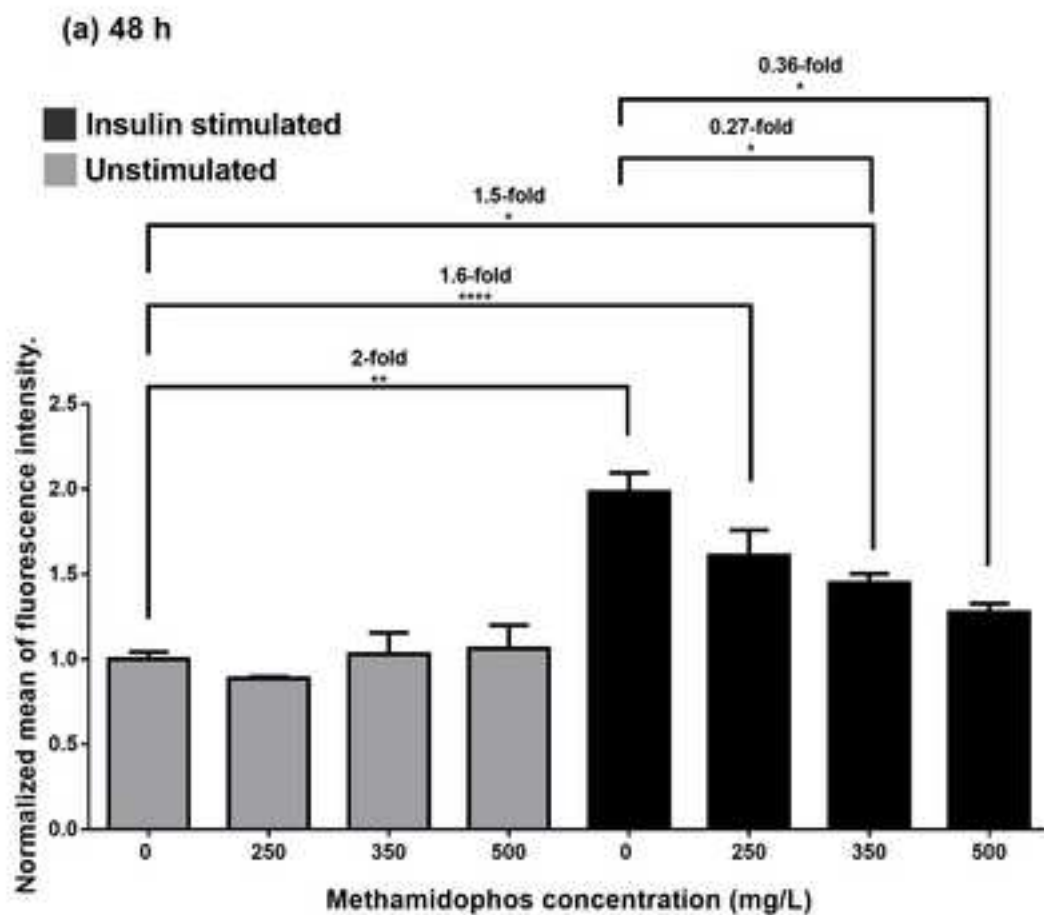
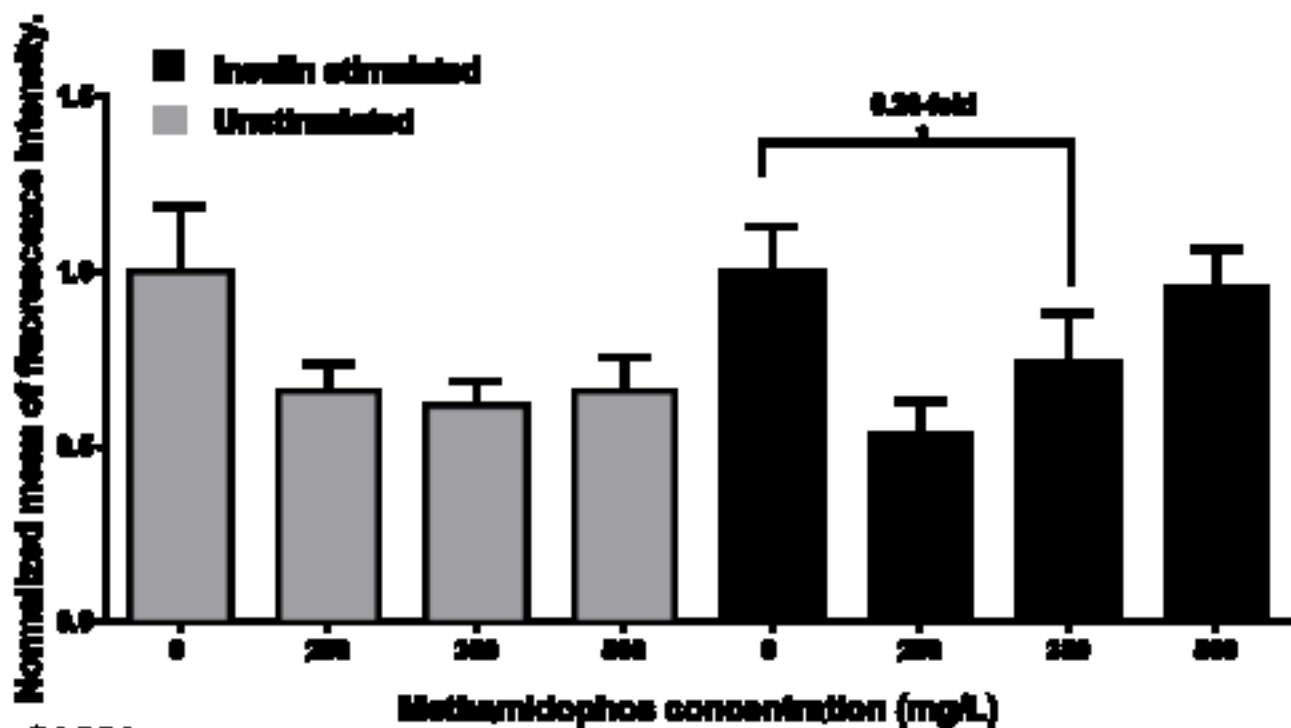
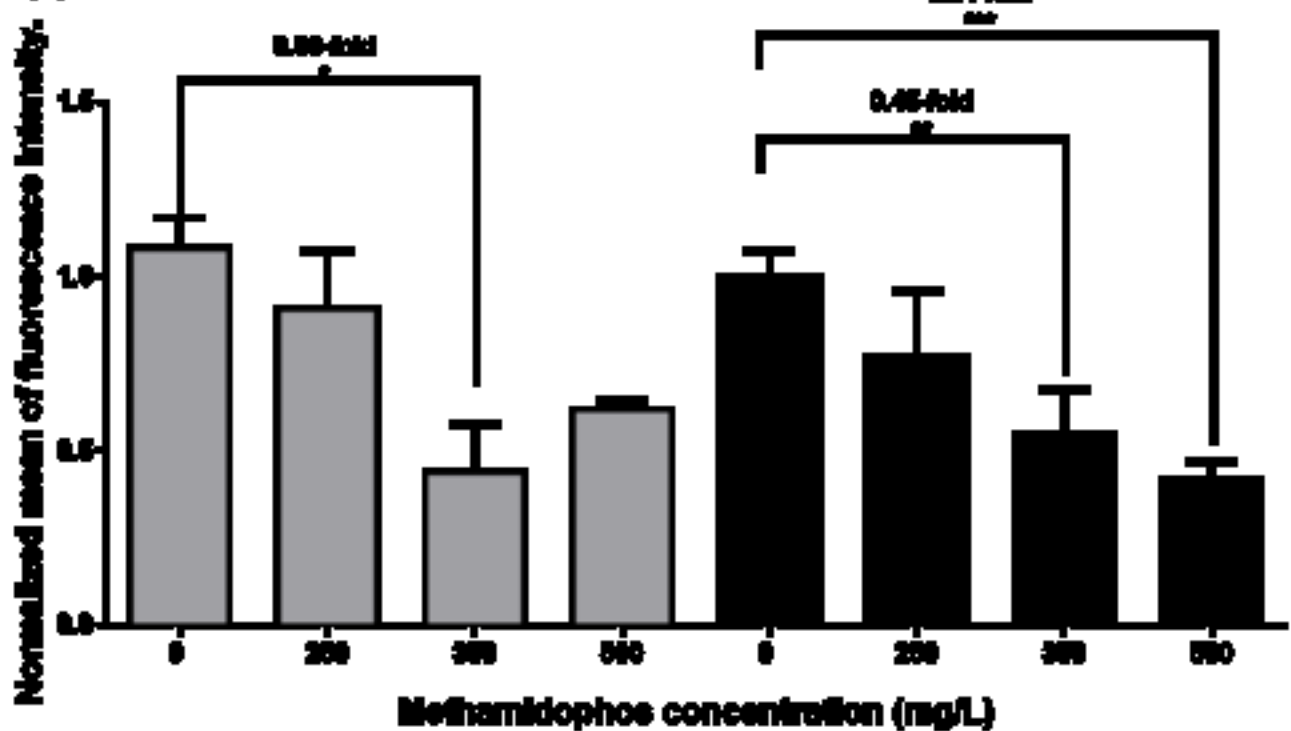


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

(a) 48 h



(b) 96 h



Capítulo 2.

Participación del estrés oxidativo en la inducción de resistencia a la insulina en células HepG2 expuestas a metamidofos.

Participación del estrés oxidativo en la inducción de resistencia a la insulina en células HepG2 expuestas a metamidofos.

Marco Antonio Ramírez-Vargas ¹, Eugenia Flores-Alfaro ², Ma. Elena Moreno-Godínez ^{1,*}

1. Laboratorio de Toxicología y Salud ambiental. Facultad De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México.
2. Laboratorio de Investigación en Epidemiología clínica y molecular. Facultad De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México.

Autor de correspondencia:

Dra. Ma. Elena Moreno-Godínez. Laboratorio de Toxicología y Salud ambiental. Unidad Académica De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México. Av. Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria Chilpancingo, Guerrero, México 39070.

Telephone: (52) (747) 4725503

Fax: (52) (747) 4725503

E-mail: emoreno20@hotmail.com

Abstract

Insulin resistance (IR) is a biological condition linked to developing chronic diseases, the exposure to organophosphate pesticides (OP) has been considered as a risk factor to develop of (IR). Methamidophos (MET) is an OP widely use in the world. The induction of oxidative stress is a mechanism through MET exert toxicological effects. Oxidative stress is a condition frequently observed in patients with IR. Hence, the objective of this work was to determine if MET could generate of IR in HepG2 cells. In addition, we investigated the relationship between IR and oxidative stress using an antioxidant. The cytotoxicity was evaluated with MTT assay, the changes in levels of intracellular reactive oxygen species (ROS), malonaldehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), were evaluated as oxidative stress biomarkers. The glycogen levels, lipid content, and glucose uptake /production, the GLUT2 levels and GLUT4 translocation in HepG2 cells were assessed as indicators of insulin resistance. The results showed that MET induced oxidative stress and insulin resistance in HepG2 cells. In another hand, the used of antioxidant decrease the oxidative stress and insulin resistance biomarkers in HepG2 cells. These results suggest that MET could induce insulin resistance through the induction of oxidative stress.

Introducción.

La resistencia a la insulina (RI), se define como la incapacidad que muestran los tejidos para responder normalmente a la acción biológica de la insulina, como consecuencia se alteran la captación de glucosa en el tejido adiposo, muscular y hepático, la producción de glucosa/ácidos grasos en el hígado y la lipólisis en los adipocitos, estas alteraciones con llevan a la perturbación del metabolismo de lípidos y de carbohidratos (Tangvarasittichai 2015a). La RI es considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como: la diabetes mellitus tipo 2, cáncer, hipertensión y accidentes cerebrovasculares (Facchini et al. 2001).

Las causas de la RI se han asociado a factores considerados como “clásicos” entre los que destacan la presencia de factores genéticos (Warram et al. 1990), de estilo vida como el sedentarismo (Taguchi and White 2008);(Sarvas et al. 2015) y el consumo de alimentos ricos en grasa y/o carbohidratos (Merat et al. 1999; Guerre-Millo 2004; Cordain et al. 2005; Prada et al. 2005). Sin embargo la exposición a contaminantes ambientales tales como los plaguicidas organofosforados (OP) ha mostrado ser un factor de riesgo independiente para el desarrollo de RI (Mostafalou 2016).

La inducción de efectos glucotóxicos y lipotóxicos, son los mecanismos de toxicidad a través de los cuales los OP pueden inducir RI. En ambos eventos existe la inducción de estrés oxidativo el cual es generado por el incremento desmesurado en los niveles de especies reactivas del oxígeno con el subsecuente daño oxidativo al DNA, lípidos y proteínas (Lasram et al. 2014a). El estrés oxidativo se ha asociado con la inhibición de la vía de señalización de la insulina (Hansen et al. 1999). Existe una gran evidencia que vincula la inducción de estrés oxidativo con el desarrollo IR (Ceriello and Motz 2004; Evans et al. 2005; Houstis et al. 2006; Henriksen et al. 2011). El metamidofos (MET) es un OP capaz de inhibir la enzima acetil colinesterasa (Emerick et al. 2012), sin embargo se ha establecido la inducción de estrés oxidativo como un mecanismo a través del cual el MET ejerce su toxicidad en modelos *in vitro* (Lu et al. 2012; Ramirez-Vargas et al. 2017) e *in vivo* (Panemangalore et al. 1999; Araoud et al. 2014).

El uso de antioxidantes como la N-acetil cisteína (NAC) reduce el efecto toxico de los OP al disminuir el estrés oxidativo (Akbulut et al. 2014; Nurulain et al. 2015; Jallouli et al. 2016; Xu et al. 2016). Por otra parte, el uso de NAC también se ha asociado con la disminución de las alteraciones metabólicas observadas modelos de RI (Haber et al. 2003; Song et al. 2005; Aardema et al. 2008). Recientemente se ha reportado la inducción de resistencia a la insulina en modelos animales expuestos a malatión es reversible cuando se utiliza NAC (Lasram et al. 2015b), los autores sugieren que la inducción de estrés oxidativo podría ser un mecanismo que promueve el desarrollo de RI. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue determinar si el MET puede inducir resistencia a la insulina y su posible asociación con el estrés oxidativo en células HepG2.

Material y métodos.

Modelo celular.

Las condiciones más frecuentemente observadas en pacientes con resistencia a la insulina son: (a) el incremento en el contenido de lípidos intracelulares en el hígado, (b) la incontrollable producción de glucosa por el hígado, y (c) la reducción de la captación y/o consumo de glucosa estimulado por insulina (Birkenfeld and Shulman 2014). Estas alteraciones conllevan al desarrollo de dislipidemia e hiperglicemia, modelos experimentales *in vivo* han mostrado que la inducción tejido específica de resistencia a la insulina en el hígado conlleva a hiperglicemia en ayunas, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, con la disminución en el contenido del glucógeno y el desarrollo de esteatohepatitis (Biddinger et al. 2008), estas entidades clínicas patológicas no se han observado en modelos experimentales en los que se ha inducido resistencia a la insulina específica del tejido muscular (Brüning et al. 1998) y del tejido adiposo (Blüher et al. 2002); lo que sugiere que la resistencia a la insulina en el hígado es el primer paso para el desarrollo de la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos. Por lo anterior en el presente estudio utilizó como modelo experimental la línea celular HepG2, la que es derivada de tejido hepático. Esta línea celular tiene la capacidad de sintetizar y secretar colesterol, lipoproteínas de alta y baja densidad, y triglicéridos (Javitt 1990), permitiendo determinar el incremento en lípidos intracelulares, por otra parte la captación de glucosa en respuesta a la estimulación con insulina, así como la síntesis de glucógeno y la producción de glucosa no se encuentran alteradas (Dongiovanni et al. 2008)(Meier et al. 2007).

Además se considera al hígado como el principal órgano involucrado en el metabolismo de los plaguicidas organofosforados (Jokanović 2001). La línea celular HepG2 muestra una inducción de CYP450 principalmente las subclases CYP3A4, 1A2, 2B6, y expresa la glutatión-S-transferasa (Westerink y Schoonen, 2007) enzimas implicadas en el metabolismo de los OP.

Plaguicida

El metamidofos utilizado fue de grado técnico (pureza >97.7%, CAS#:10265-92-6), el cual fue adquirido de Sigma-Aldrich (Seelze-GER), el cual fue disuelto en DMSO pureza del 99.9% (Sigma-Aldrich, Fulda, GER), considerando que el volumen final del solvente en los cultivos celulares fuera menor al 1%.

Cultivo celular

Las células HepG2 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico/antimicótico al 1% (10 U de penicilina, 0.01 mg de estreptomycin y 0.025 µg anfotericina B), he incubadas a 37 °C, en un ambiente humidificado con CO₂ al 5%.

Pretratamiento con NAC.

Antes de realizar el tratamiento con el plaguicida, las células fueron expuestas a 10 mM de NAC grado farmacológico (pureza >99.9%, CAS#:616-91-1) por 2 h, posteriormente el medio fue removido y las células fueron lavadas tres veces con PBS.

Citotoxicidad

El efecto citotóxico del MET se determinó usando el ensayo colorimétrico cuantitativo de MTT, utilizando las condiciones propuestas por (Mosmann 1983). Para este ensayo se utilizaron 100 000 cel/mL en placas de 96 pocillos en un volumen final de 200 µL. Posterior al tratamiento el medio fue retirado y se adicionó 100 µL de MTT (0.5 mg/mL) y se incubaron por 2 h. Posterior a la incubación se retiró el medio de cultivo y los cristales de formazan se disolvieron con 100 µL de DMSO, las placas se mantuvieron en movimiento durante 10 min, y la absorbancia se determinó a 545 nm usando 600 nm como longitud de onda referente. En cada prueba se utilizarán controles de vehículo (células tratadas con <1% de DMSO). Se consideró como concentraciones citotóxicas aquellas que fueron capaces de reducir más del 20% la viabilidad celular (LC=20%). Cada concentración ensayada se realizó por sextuplicado en tres experimentos independientes. Las concentraciones utilizadas para ensayos posteriores fueron no citotóxicas.

Biomarcadores de estrés oxidativo

Determinación de ROS

La generación intracelular de especies reactivas del oxígeno se determinó utilizando la sonda fluorogénica CellROX® Green (Life Technologies, Eugene, OR) siguiendo las especificaciones del fabricante, para ello 3×10^5 células por mL (en placas de 24 pozos en un volumen final 500 µL) se expusieron a 350 y 500 mg/L, en tiempos de 6 h, una vez terminado el tiempo de exposición las células se incubaron con 5 µM de CellROX por 30 min, el exceso de sonda fue eliminada al realizar tres lavados con PBS, entonces las células se re-suspendieron en 3 mL de PBS y la fluorescencia se determinó a 485/520 nm utilizando el citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA). Determinando 100 000 eventos por condición ensayada, el análisis se realizó utilizando el software FACSDIVA V 6.1.3 (Becton Dickinson). Cada experimento se realizó por triplicado, en dos momentos independientes, en cada ensayo se utilizaron controles basales (células en medio de cultivo) y controles de vehículo (células con <1 % de DMSO).

Lipoperoxidación

El daño lipoperoxidativo se evaluó mediante la cuantificación de malonaldehído (MDA) utilizando el kit "LOP-FR 12" (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI), este ensayo se basa en la reacción del reactivo cromogénico N-metil-2-fenilindol con el MDA a 45°C el resultando en un compuesto cromogénico, para ello 1.5×10^6 cél/mL se expusieron a 350- o 500-mg/L, en tiempos de 48 o 96 h, posteriormente el medio se remueve y se realizan lavados con PBS, las células se recuperaron y homogenizaron en 20 µL de Tris-HCl a 50 mM a pH 7.4 y fueron sometidas a 5 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido/baño maría a 45 °C, seguido de la adición de 15 µL de N-metil-2-fenilindol y 15 µL de ácido clorhídrico 12 N. Esta mezcla se incubó por 1 h a 45°C seguido de la centrifugación a 14 000 r.p.m. por 15 min, el sobrenadante fue recuperado y la absorbancia se determinó a 586 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Atlanta, GO). Las concentraciones de MDA generado se calcularon en base a una curva estándar. Cada condición se realizó por duplicado en dos experimentos

independientes. En cada ensayo se utilizaron controles basales (células en medio de cultivo) y controles de vehículo (células con <1 % de DMSO).

Determinación de glutatión reducido (GSH)

Se determinó las concentraciones de GSH utilizando el kit "Glutathion Assay" (Calbiochem, San Diego, CA). Este ensayo se basa en una reacción química que se realiza en dos fases. La primera fase conduce a la formación de productos de sustitución (tioéteres) y la segunda fase es una reacción de eliminación que se lleva a cabo en condiciones alcalinas, que específicamente transforma el producto de sustitución obtenido con GSH en un cromóforo con una absorbancia máxima a 400 nm. Para este experimento 1.5×10^6 células se expusieron a 350- o 500-mg/L, en tiempos de 48 o 96 h, terminado el tiempo de exposición el medio fue removido y se realizaron 3 lavados con PBS, entonces las células se re-suspendieron en 30 μ L de ácido metafosfórico (al 5% P/V en agua destilada) e inmediatamente se agitaron a 4°C, las células lisadas se centrifugaron a 3000 g a 4°C por 10 minutos. Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a 4°C durante 1 h. Seguido de la adición de 60 μ L de reactivo 1 y se mezcló, a esta mezcla se adiciono 5 μ L de NaOH al 30%. Esta mezcla se incubó por 10 min a 25°C en oscuridad, la absorbancia fue determinada a 400 nm, las concentraciones fueron calculadas en base a una curva estándar. Cada condición se realizó por triplicado en dos momentos independientes. En cada ensayo se utilizó controles basales (células en medio de cultivo) y controles de vehículo (células con <1 % de DMSO).

Marcadores de evaluación de la resistencia a la insulina.

Alteración en la captación de glucosa

Para determinar el efecto de MET en la captación de glucosa estimulada por insulina se determinó usando el análogo fluorescente de la D-glucosa (2-[N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino]-2-deoxy-D-glucose, 2-NBDG), para ello se utilizó la metodología propuesta por (Zou et al. 2005b) con algunas modificaciones de manera breve: 3×10^5 cel/mL fueron expuesta por 48 o 96 h a tratamientos con 350 y 500 mg/L de MET las células fueron lavadas con PBS. Posteriormente las células fueron expuestas por 10 min a 100 nm de insulina en medio DMEM libre de glucosa y de SFB, posteriormente se adicionó 10 nM del 2-NDBG y se incubó por 30 min. El medio fue removido y se realizaron 2 lavados con PBS a 4°C, seguido de la tripsinación de las células. La absorción de la glucosa se determinó mediante citometría de flujo usando la longitud de excitación emisión a 465/540 nm del 2-NBDG.

Contenido de lípidos intracelulares

Para determinar el contenido de lípidos intracelulares se utilizó la tinción de rojo oleoso de acuerdo a lo propuesto por (Liu et al. 2011), de manera breve 3×10^5 cel/mL fueron expuestas a 350 ó 500 mg/L por 96 o 48 h, al terminar el tratamiento las células fueron lavadas con PBS; posteriormente las células se fijaron con formaldehído al 4% por 30 min, seguido de una tinción con Rojo Oleoso O (3mg/mL) por 30 min, el exceso de colorante se eliminó por lavados con agua destilada,

posteriormente se agregó 1 mL de isopropanol, el sobrenadante se recuperó y la absorbancia se determinó a 510 nm, el contenido de lípidos se reportó como veces de cambio respecto a las células control.

Producción de glucosa

La modificación en la producción de glucosa por exposición a MET se realizó de acuerdo a lo establecido por (Cordero-Herrera et al. 2014b), de manera breve se utilizaron 2×10^5 cel las cuales se expusieron a 350 y 500 mg/L por 6h, una vez concluidos los periodos de exposición se reemplazó el medio de cultivo por medio DMEM libre de glucosa y rojo de fenol el cual contenía 20 mM de lactato de sodio y 2 mM de piruvato de sodio. Las células se incubaron por 3 h, posteriormente el sobrenadante se recolectó y se determinó el contenido de glucosa utilizando el kit de glucosa peroxidasa de la casa comercial Sigma Aldrich-México. Las determinaciones se normalizaron mediante la cuantificación de proteínas.

Translocación de GLUT 4 a la membrana y niveles de GLUT 2.

La determinación de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática de la célula HepG2 en presencia del estímulo de insulina así como los niveles de GLUT2 fueron determinados, utilizando el protocolo propuesto por (Koshy et al. 2010). Para ello las células HepG2 se sembraron a una densidad de 200 000 cél/mL en placas de 24 pozos y se expusieron a 350 y 500 mg/L por 48 o 96 h. Culminando el tiempo de exposición a los OP por diferentes tiempos de exposición, las células fueron lavadas e incubadas con medio libre de suero fetal bobino por 12 h. Después, las células fueron tripsinizadas e incubadas por 2 h para permitir su recuperación. Posteriormente se adicionaron 100 nM de insulina por 30 min y se expusieron al anticuerpo anti-GLUT4 (1:50, ab65267, Abcam) o Anti-GLUT2 (1:50, ab85715) y al anticuerpo secundario DyLight-488 (1:40, ab96879, Abcam). Entonces, las células fueron fijados con formaldehído al 1% por 20 min, entonces las células fueron re-suspendidas y la fluorescencia fue determinada at 493/518 nm usando el utilizando el citómetro de flujo FACS CANTO II analizando 100 000 eventos por condición.

Contenido de glucógeno.

Las concentraciones de glucógeno fueron determinadas utilizando el reactivo de "Antrona" (Sigma-Aldrich-Mex) siguiendo la metodología propuesta por (Yan et al. 2016). Para esto, 3×10^6 cel/mL fueron expuestas por 6 h a 350 y 500 mg/L de MET. Posteriormente el medio fue removido y las células fueron lavadas con PBS, y cosechadas, estas fueron digeridas con 500 μ L de KOH al 30% (p/v) a 100 °C por 20 min, al finalizar las células fueron centrifugadas a 12 000 g por 15 min, el sobrenadante fue decantado y se agregaron 1.5 mL de etanol, las muestras se volvieron a centrifugar y se descartó el sobrenadante, entonces las muestras se incubaron a 55 °C. Los precipitados fueron disueltos en 500 μ L de agua destilada, a esta mezcla se le adicionó 1 mL del reactivo de antrona (0.2% p/v), y las muestras se incuban a 100 °C por 20 min. La absorbancia es determinada a 620 nm. La concentración de glucógeno fue calculada a partir de una curva estándar, las concentraciones de glucógeno fueron normalizadas con la cantidad de proteínas.

Resultados.

Efecto del MET sobre la viabilidad de HepG2.

Como se muestra en la figura 1, la exposición a MET por 48 ó 96 h no reduce más del 20% de la viabilidad celular (efecto citotóxico). Sin embargo la reducción observada en la viabilidad celular es revertida con el pretratamiento de NAC (figura 1).

Efecto del MET sobre la inducción de ROS.

La exposición por 6h a 350 ó 500 mg/L incrementó la producción de ROS por 2.5-veces y 2.7-veces respectivamente. El pre tratamiento con NAC inhibió e incremento en ROS (figura 2).

Efecto del MET sobre la lipoperoxidación.

El MET incrementó los niveles de malonaldehído a dosis de 350 y 500 mg/L cuando las células fueron expuestas por 48 ó 96 h. el pretratamiento con NAC inhibió la generación de MDA a 48 h, mientras que a 96 h sólo existió una disminución significativa de los niveles de MDA, en comparación con los tratamientos realizados solamente con el MET (figura 3).

Efecto del MET sobre los niveles de GSH.

El pretratamiento con NAC inhibió la depleción de GSH observada en células expuestas por 48 ó 96 h a MET (350 ó 500 mg/L) (figura 4).

Efecto del MET sobre la producción de glucosa y niveles de glucógeno.

La exposición a MET por 6 h incremento la producción de glucosa en 3.7-veces y 4-veces más en comparación con el control a las dosis de 350 y 500 mg/L respectivamente. Los niveles de glucógeno disminuyeron 0.35-veces y 0.41-veces cuando las células fueron expuestas a 350 ó 500 mg/L respectivamente. El pretratamiento con NAC inhibió la producción de glucosa y la depleción en los niveles de glucógeno (figura 5).

Efecto del MET sobre el contenido de lípidos intracelulares.

El contenido de lípidos intracelulares se incrementó durante la exposición a 48 h al MET en 0.26-veces para las dosis de 350 y 500 mg/L., mientras que la exposición a 96 h incrementó 0.81-veces y 1.07-veces el contenido de lípidos para las dosis de 350 y 500 mg/L respectivamente. El pretratamiento con NAC disminuyó e incremento exacerbado del contenido lipídico (figura 6).

Efecto del MET sobre la captación de glucosa.

La exposición de MET disminuye la captación de glucosa inducida por la insulina, la disminución fue de 0.83-veces y 0.77-veces para las dosis de 350 ó 500 mg/L cuando las células se expusieron por 48 h. Para la exposición de 96 h la disminución en la captación de glucosa estimulada por insulina fue de 0.89-veces para las dosis de 350 y 500 mg/L. El uso de NAC previno la disminución exacerbada en el consumo

de glucosa. La disminución de las células pretratadas con NAC y expuestas a MET fue de 0.3-veces y .4-veces para las dosis de 350 ó 500 mg/L a 48 y 96 h (figura 7).

Efecto del MET sobre la translocación de GLUT4.

La exposición a MET por 48 h disminuye la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática estimulada por insulina, la disminución es de 0.37-veces y 0.44-veces para las dosis de 350 ó 500 mg/L. El pretratamiento con NAC protege de la disminución de la translocación de GLUT4 solo a la dosis de 350 mg/L. El tratamiento con MET a 96 h disminuye la translocación de GLUT4 en 0.41-veces y 0.55-veces para las dosis de 350 y 500 mg/L respectivamente. El pretratamiento con NAC reduce la no translocación de GLUT4 (figura 8).

Efecto del MET sobre los niveles de GLUT2.

La NAC inhibe la reducción de GLUT2 en células expuestas a MET por 48h, el tratamiento solo con 350 mg/L de MET reduce 0.4-veces los niveles de GLUT2. La exposición a 350 ó 500 mg/L de MET por 96 h reduce los niveles de GLUT2 en 0.4-veces y 0.6-veces respectivamente. Esta reducción es inhibida por el pretratamiento de NAC (figura 9).

Discusión.

La RI es una condición clínico patología asociada con el desarrollo de diversas enfermedades crónico degenerativas (Laakso and Kuusisto 2014), si bien sus causas son multifactoriales, recientemente diversos estudios han evidenciado a la exposición a OP como un factor de riesgo que podría promover el desarrollo de esta patología (Hectors et al. 2013; Mostafalou 2016). Se sabe que el estrés oxidativo tiene un papel fundamental en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Furukawa et al. 2017), a su vez la inducción de estrés oxidativo es un mecanismo de toxicidad a través del cual los OP ejercen su toxicidad (Lukaszewicz-Hussain 2010), por lo cual en el presente trabajo evaluamos si la exposición de HepG2 a MET induce resistencia a la insulina y si esta está relacionada con la inducción de estrés oxidativo. Para ello utilizamos el antioxidante N-acetil-cisteína el cual es considerado como un carroñero específico de ROS, además de ser un inductor de la defensa antioxidante (Mokhtari et al. 2017). Los resultados obtenidos muestran que la exposición a MET indujo la resistencia a la insulina en el modelo celular propuesto, además de inducir estrés oxidativo. El uso de NAC redujo los marcadores de resistencia a la insulina e inhibió la generación de estrés oxidativo. Estos resultados establecen la posibilidad de que los OP pueden generar resistencia a la insulina a través de la inducción de estrés oxidativo.

El incremento de los niveles intracelulares de ROS es un mecanismo de toxicidad que pueden ejercer la mayoría de los OP (**Lukaszewicz-Hussain 2010**), en el presente estudio se observó que la exposición a MET induce el incremento en los niveles intracelulares de ROS. El mecanismo a través del cual los OP promueven la inducción de ROS es por: (a) la generación de radicales libres al interaccionar directamente con el oxígeno molecular, ó al cambiar la valencia de iones quelantes (reacción de fenton), (b) por la depleción de los sistemas antioxidantes (**Pearson**

and Patel 2016). En este sentido se ha reportado que la exposición al MET promueve la generación de ROS en células mononucleares humanas (PBMC) (**Ramirez-Vargas et al. 2017**) y en células PC12 (**Lu et al. 2012**) en las cuales fue reportado la disminución en enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. Por otro parte, el pretratamiento con NAC inhibió el incremento en ROS en las células expuestas a MET. El NAC es considerado como un carroñero específico de ROS, pues puede interactuar directamente con estas moléculas a través por el grupo sulfhidrilo de la NAC, el cual se puede reaccionar con el anión hidroxilo (-OH) y formar H₂O disminuyendo el potencial oxidativo de ROS, el producto de esta reacción es el anión tiólico el cual puede reaccionar con H₂O₂, degradándolo (**Sun 2010**). La disminución de ROS inducidas por MET en respuesta a un antioxidante también se ha observado al utilizar vitamina E en células PC12 (**Lu et al. 2012**).

La lipoperoxidación es evento final en la inducción de estrés oxidativo, es evidencia del incremento desmesurado de ROS y la incapacidad del sistema antioxidante celular para contrarrestar el potencial oxidativo de ROS (**Halliwell and Poulsen 2006**), el producto final es el malonaldehído (MDA) el cual se origina por el ataque oxidativo de las ROS sobre los grupos metil de los ácidos grasos poliinsaturados (**Saquib et al. 2012**). En el presente estudio la exposición por 96 o 48 h a 350 y 500 mg/L de MET induce el incremento en MAD en HepG2. El incremento puede ser atribuido al incremento en ROS observado a las 6 h de exposición. La inducción de daño lipoperoxidativo por la exposición a MET se ha observado en PBMC y en PC12, en ambos modelos celulares el incremento en MDA fue atribuido al incremento en ROS (**Lu et al. 2012; Ramirez-Vargas et al. 2017**). El uso de NAC inhibió el daño lipoperoxidativo en las células expuestas, se sabe que NAC incrementa la actividad de catalasa (enzima antioxidante encargada de la degradación de H₂O₂) en células HepG2 (**Oh and Lim 2006**). Este podría ser un mecanismo a través del cual NAC, disminuye el daño lipoperoxidativo. Son necesarios más estudios enfocados en determinar el efecto de MET sobre la expresión de enzimas antioxidantes.

La disminución en los niveles de GSH puede ser atribuido al incremento en mecanismo de desintoxicación celular, en el cual el xenobiótico es conjugado con una molécula de GSH para incrementar su hidrosolubilidad e inhibir su potencial tóxico, también puede existir una depleción por la reacción directa con ROS (**Lu 2009**). En el presente estudio la exposición a MET por 48 ó 96 h disminuyó los niveles de GSH, lo cual puede ser atribuido al incremento en ROS ó a reacciones de conjugación. Existe evidencia de la disminución de GSH atribuido al incremento en ROS en células PC12 expuestas a MET (**Lu et al. 2012**). También se ha demostrado que el MET incrementa la expresión de la glutatión transferasa (enzima implicada en reacciones de conjugación) en peces expuestos a 10 mg/L por 72 h (**Peng et al. 2015**). Por otra parte, el uso NAC previno la depleción de GSH, se sabe que NAC es un precursor de la síntesis de GSH en hepatocitos; una vez que se adsorbe la NAC esta es des-acetilada para formar L-cisteína, esta es conjugada con glutamato o con glutatión oxidado para formar Glutatión reducido, esta reacción es catalizada por la enzima gamma-glutamil-cisteína (**Forman et al. 2009**). La

inhibición de ROS o la inducción de la síntesis *de novo* de GSH podrían ser los mecanismo asociados a la protección de NAC frente a MET.

El incremento en la producción de glucosa por el hígado así como la disminución del contenido de glucógeno son características asociadas con la inducción de resistencia a la insulina (Birkenfeld and Shulman 2014). En el presente trabajo se observó que la exposición a MET incrementa la producción de glucosa y que esta es asociada con la disminución en los niveles de glucógeno. Esta asociación podría ser atribuida al incremento en la actividad de enzimas asociadas con la glicolisis tales como la glucógeno fosforilasa, o por el incremento en enzimas implicadas en la neo glucogénesis tales como la fosfofructoquinasa, en este sentido se ha demostrado que la exposición de ratas a 200 mg/kg de malati3n incremento la actividad de estas enzimas con la subsecuente disminuci3n del gluc3geno (Abdollahi et al. 2004; Pournourmohammadi et al. 2005). Es necesario realizar m3s estudios del efecto de MET sobre estas enzimas. El efecto protector de la NAC puede ser atribuido a la disminuci3n de la actividad de la enzima gluc3geno fosforilasa que produce la NAC (Manov et al. 2002).

La exposici3n a OP promueven la s3ntesis *de novo* de l3pidos en c3lulas hep3ticas expuestas, a trav3s de la activaci3n de elementos de respuesta a esteroides (Howell et al. 2016). Tambi3n se ha observado que existe una disminuci3n en la excreci3n de l3pidos sintetizados y un aumento en la captaci3n de l3pidos extracelulares (Howell et al. 2016). En el presente estudio se observ3 el incremento en el contenido lip3dico de HepG2 expuestas a MET lo cual puede ser atribuido a la s3ntesis *de novo* de estas biomol3culas. El uso de NAC disminuy3 el incremento en el contenido lip3dico, se ha reportado que en ratas expuestas a malati3n existe un incremento en el contenido lip3dico del h3gado y que este fue reversible cuando se utiliz3 un pretratamiento con NAC (Lasram et al. 2014c), se sabe que la NAC disminuye a la glutaraldehido deshidrogenasa enzima implicada en la s3ntesis de 3cidos grasos (Mehta et al. 2002; Calzadilla et al. 2011).

La exposici3n a MET reduce significativamente la captaci3n de glucosa en HepG₂ en respuesta a insulina. La captaci3n de glucosa del medio extracelular es uno de los eventos finales de la v3a de PI3K-Akt activada por insulina, el decremento en la captaci3n de glucosa en c3lulas tratadas respecto al control sugiere un mecanismo de regulaci3n negativa de la v3a de PI3K-Akt (White 2003). Uno de los reguladores negativo de la v3a de PI3K-Akt es JNK la cual promueve la degradaci3n de los IRS (Lee et al. 2003a), esta puede ser activada en respuesta a la inducci3n de estr3s oxidativo (Pal et al. 2015).

Existe gran evidencia que relacionan la inducci3n de estr3s oxidativo con el incremento en la actividad de JNK por la exposici3n a OP (Caughlan et al. 2004; Shen and Liu 2006; Liu et al. 2010; Ki et al. 2013b; Batista et al. 2016), como se mencion3 anteriormente la exposici3n al MET incrementa los niveles de ROS, pudi3ndose activar JNK mas estudios son necesarios para evidenciar este proceso. Evidencia que sustenta este probable mecanismo es el hecho de que el pretratamiento con NAC incrementa la captaci3n de glucosa en respuesta a insulina,

se sabe que NAC disminuye la actividad de JNK al prevenir su activación por las ROS (Wang et al. 2014).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el MET disminuye la translocación de GLUT 4 estimulada por insulina en HepG2, un marcador fuertemente asociado con la inducción de resistencia a la insulina. La disminución en la translocación de GLUT4 estimulada por la insulina podría atribuirse a incremento en la expresión de CYP450. Se conoce que el aumento en la expresión de CYP450 (isoforma CYP2E1) en células L6 derivadas de músculo esquelético conduce a la inhibición de la translocación de GLUT4 estimulada por insulina, se sugieren la activación de NRF2 inhibe la translocación de GLUT4 (Armoni et al. 2014a). Además, se demostró que la inhibición de ROS (por antioxidantes como la vitamina E o N-acetil-1-cisteína) o CYP2E1 (por el clorometiazol, un inhibidor específico de CYP2E1) protege las células de la inhibición de la translocación de GLUT4 estimulada por la insulina. (Armoni et al. 2014), estos datos son concordantes con lo observado en el presente estudio en el cual el pretratamiento de NAC mejora la translocación de GLUT4. Se necesitan más estudios para evidenciar el papel de la expresión de CYP450 en la inducción de resistencia a la insulina en células expuestas a MET.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la exposición a MET disminuye los niveles de GLUT2 en células HepG2. Se conoce que la disminución en los niveles de RNAm y de proteína del GLUT2 es un marcador de resistencia a la insulina en células HepG2 (Aravinthan et al. 2015). Se atribuye estos resultados a la incapacidad de la insulina para fosforilar a Akt; ya que Akt-fosforilada inhibe la acción de FoxO1 un represor de Pdx1 factor que promueve la síntesis de GLUT2 (Song et al. 2016). Por otra parte FoxO1 puede ser activado por JNK, la cual a su vez puede ser activada por ROS, la utilización de NAC podrían disminuir la actividad de JNK la cual no activaría a FoxO1 reduciendo la represión de Pdx1 incrementando los niveles de GLUT2. Más estudios son necesarios para evaluar la participación de FoxO1 en el desarrollo de resistencia a la insulina inducida por MET.

Conclusiones.

Los resultados en el presente estudio son evidencia de la participación del estrés oxidativo como un mecanismo a través del cual los plaguicidas organofosforados promueven la inducción de resistencia a la insulina. Si bien los parámetros de resistencia a la insulina disminuyen utilizando un antioxidante, también se observa que existe una resistencia a la insulina remanente que no puede ser explicada solo por la inducción de estrés oxidativo. Por lo cual, es necesario evaluar otros mecanismos moleculares a través de los cuales los OP ejercen su toxicidad como son los cambios en los patrones de fosforilación proteica.

REFERENCIAS.

Aardema, H., Meertens, J.H.J.M., Ligtenberg, J.J.M., Peters-Polman, O.M., Tulleken, J.E., Zijlstra, J.G., 2008. Organophosphorus pesticide poisoning: cases and developments. *Neth. J. Med.* 66, 149–153.

- Abdollahi, M., Donyavi, M., Pournourmohammadi, S., Saadat, M., 2004. Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 137, 343–347.
- Akbulut, S., Elbe, H., Eris, C., Dogan, Z., Toprak, G., Otan, E., Erdemli, E., Turkoz, Y., 2014. Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *World J. Gastroenterol.* 20, 10158–10165. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.10158>
- Araoud, M., Neffeti, F., Douki, W., Khaled, L., Najjar, M.F., Kenani, A., Houas, Z., 2014. Toxic effects of methamidophos on paraoxonase 1 activity and on rat kidney and liver and ameliorating effects of alpha-tocopherol. *Environ. Toxicol.* <https://doi.org/10.1002/tox.22095>
- Aravinthan, A., Challis, B., Shannon, N., Hoare, M., Heaney, J., Alexander, G.J.M., 2015. Selective insulin resistance in hepatocyte senescence. *Exp. Cell Res.* 331, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.025>
- Armoni, M., Harel, C., Ramdas, M., Karnieli, E., 2014. CYP2E1 Impairs GLUT4 Gene Expression and Function: NRF2 as a Possible Mediator. *Horm. Metab. Res.* 46, 477–483. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363990>
- Batista, J.E.S., Sousa, L.R., Martins, I.K., Rodrigues, N.R., Posser, T., Franco, J.L., 2016. Data on the phosphorylation of p38MAPK and JNK induced by chlorpyrifos in *Drosophila melanogaster*. *Data Brief* 9, 32–34.
- Biddinger, S.B., Hernandez-Ono, A., Rask-Madsen, C., Haas, J.T., Alemán, J.O., Suzuki, R., Scapa, E.F., Agarwal, C., Carey, M.C., Stephanopoulos, G., Cohen, D.E., King, G.L., Ginsberg, H.N., Kahn, C.R., 2008. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell Metab.* 7, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.013>
- Birkenfeld, A.L., Shulman, G.I., 2014. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology* 59, 713–723. <https://doi.org/10.1002/hep.26672>
- Blüher, M., Michael, M.D., Peroni, O.D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B.B., Kahn, C.R., 2002. Adipose Tissue Selective Insulin Receptor Knockout Protects against Obesity and Obesity-Related Glucose Intolerance. *Dev. Cell* 3, 25–38. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00199-5](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00199-5)
- Brüning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Hörsch, D., Accili, D., Goodyear, L.J., Kahn, C.R., 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell* 2, 559.
- Calzadilla, P., Sapochnik, D., Cosentino, S., Diz, V., Dicelio, L., Calvo, J.C., Guerra, L.N., 2011. N-acetylcysteine reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 6936–6951.

Caughlan, A., Newhouse, K., Namgung, U., Xia, Z., 2004. Chlorpyrifos Induces Apoptosis in Rat Cortical Neurons that is Regulated by a Balance Between p38 and ERK/JNK MAP Kinases. *Toxicol. Sci.* 78, 125–134. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh038>

Ceriello, A., Motz, E., 2004. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 816–823.

Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O'Keefe, J.H., Brand-Miller, J., 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 341–354.

Cordero-Herrera, I., Martín, M.Á., Goya, L., Ramos, S., 2014. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 64, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.014>

Dongiovanni, P., Valenti, L., Ludovica Fracanzani, A., Gatti, S., Cairo, G., Fargion, S., 2008. Iron Depletion by Deferoxamine Up-Regulates Glucose Uptake and Insulin Signaling in Hepatoma Cells and in Rat Liver. *Am. J. Pathol.* 172, 738–747. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070097>

Emerick, G.L., DeOliveira, G.H., Oliveira, R.V., Ehrich, M., 2012. Comparative in vitro study of the inhibition of human and hen esterases by methamidophos enantiomers. *Toxicology* 292, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.12.004>

Evans, J.L., Maddux, B.A., Goldfine, I.D., 2005. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 1040–1052.

Facchini, F.S., Hua, N., Abbasi, F., Reaven, G.M., 2001. Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3574–3578. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7763>

Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A., 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30, 1–12.

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I., 2017. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752–1761.

Guerre-Millo, M., 2004. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 30, 13–19.

Haber, C.A., Lam, T.K., Yu, Z., Gupta, N., Goh, T., Bogdanovic, E., Giacca, A., Fantus, I.G., 2003. N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 285, E744–E753.

Halliwell, B., Poulsen, H., 2006. Oxidative Stress, in: Halliwell, B.B., Poulsen, H.E. (Eds.), *Cigarette Smoke and Oxidative Stress*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–4.

Hansen, L.L., Ikeda, Y., Olsen, G.S., Busch, A.K., Mosthaf, L., 1999. Insulin Signaling Is Inhibited by Micromolar Concentrations of H₂O₂ EVIDENCE FOR A ROLE OF H₂O₂ IN TUMOR NECROSIS FACTOR α -MEDIATED INSULIN RESISTANCE. *J. Biol. Chem.* 274, 25078–25084.

Hectors, T.L.M., Vanparys, C., Van Gaal, L.F., Jorens, P.G., Covaci, A., Blust, R., 2013. Insulin resistance and environmental pollutants: experimental evidence and future perspectives. *Environ. Health Perspect.* 121, 1273–1281. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307082>

Henriksen, E.J., Diamond-Stanic, M.K., Marchionne, E.M., 2011. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 993–999.

Houstis, N., Rosen, E.D., Lander, E.S., 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944–948.

Howell, G.E., Mulligan, C., Young, D., Kondakala, S., 2016. Exposure to chlorpyrifos increases neutral lipid accumulation with accompanying increased de novo lipogenesis and decreased triglyceride secretion in McArdle-RH7777 hepatoma cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 32, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.002>

Jallouli, M., Dhoub, I.E.B., Dhoub, H., Lasram, M., Gharbi, N., El Fazaa, S., 2016. Disruption of steroidogenesis after dimethoate exposure and efficacy of N-acetylcysteine in rats: an old drug with new approaches. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 7975–7984.

Javitt, N.B., 1990. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 4, 161–168.

Jiang, J., Yu, S., Jiang, Z., Liang, C., Yu, W., Li, J., Du, X., Wang, H., Gao, X., Wang, X., 2014. N-Acetyl-Serotonin Protects HepG2 Cells from Oxidative Stress Injury Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/310504>

Jokanović, M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166, 139–160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)

Ki, Y.-W., Park, J.H., Lee, J.E., Shin, I.C., Koh, H.C., 2013. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. *Toxicol. Lett.* 218, 235–245.

Koshy, S., Alizadeh, P., Timchenko, L.T., Beeton, C., 2010. Quantitative measurement of GLUT4 translocation to the plasma membrane by flow cytometry. *J. Vis. Exp. JoVE.* <https://doi.org/10.3791/2429>

Laakso, M., Kuusisto, J., 2014. Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 293–302.

Lasram, M.M., Dhoub, I.B., Annabi, A., El Fazaa, S., Gharbi, N., 2014a. A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. *Toxicology* 322, 1–13.

Lasram, M.M., El-Golli, N., Lamine, A.J., Douib, I.B., Bouzid, K., Annabi, A., El Fazaa, S., Abdelmoula, J., Gharbi, N., 2015. Changes in glucose metabolism and reversion of genes expression in the liver of insulin-resistant rats exposed to malathion. The protective effects of N-acetylcysteine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 215, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.002>

Lasram, M.M., El-Golli, N., Lamine, A.J., Douib, I.B., Bouzid, K., Annabi, A., El Fazaa, S., Abdelmoula, J., Gharbi, N., 2014b. Changes in glucose metabolism and reversion of genes expression in the liver of insulin-resistant rats exposed to malathion. The protective effects of N-acetylcysteine. *Gen. Comp. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.002>

Lee, Y.H., Giraud, J., Davis, R.J., White, M.F., 2003. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 278, 2896–2902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208359200>

Liu, H., Liu, J., Xu, L., Zhou, S., Li, L., Liu, W., 2010. Enantioselective cytotoxicity of isocarbophos is mediated by oxidative stress-induced JNK activation in human hepatocytes. *Toxicology* 276, 115–121.

Liu, J.-F., Ma, Y., Wang, Y., Du, Z.-Y., Shen, J.-K., Peng, H.-L., 2011. Reduction of lipid accumulation in HepG2 cells by luteolin is associated with activation of AMPK and mitigation of oxidative stress. *Phyther. Res. PTR* 25, 588–596. <https://doi.org/10.1002/ptr.3305>

Lu, S.C., 2009. REGULATION OF GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Mol. Aspects Med.* 30, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>

Lu, X.T., Ma, Y., Wang, C., Zhang, X.F., Jin, D.Q., Huang, C.J., 2012. Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *J. Environ. Sci. Health B* 47, 445–454. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.663312>

Lukaszewicz-Hussain, A., 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.006>

Manov, I., Hirsh, M., Iancu, T.C., 2002. Acetaminophen hepatotoxicity and mechanisms of its protection by N-acetylcysteine: a study of Hep3B cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53, 489–500.

Mehta, K., Van Thiel, D.H., Shah, N., Mobarhan, S., 2002. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr. Rev.* 60, 289–293.

Meier, M., Klein, H.H., Kramer, J., Drenckhan, M., Schütt, M., 2007. Calpain inhibition impairs glycogen syntheses in HepG2 hepatoma cells without altering insulin signaling. *J. Endocrinol.* 193, 45–51. <https://doi.org/10.1677/joe.1.07087>

- Merat, S., Casanada, F., Sutphin, M., Palinski, W., Reaven, P.D., 1999. Western-Type Diets Induce Insulin Resistance and Hyperinsulinemia in LDL Receptor-Deficient Mice But Do Not Increase Aortic Atherosclerosis Compared With Normoinsulinemic Mice in Which Similar Plasma Cholesterol Levels Are Achieved by a Fructose-Rich Diet. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1223–1230. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.5.1223>
- Mokhtari, V., Afsharian, P., Shahhoseini, M., Kalantar, S.M., Moini, A., 2017. A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. *Cell J.* 19, 11–17.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mostafalou, S., 2016. Persistent Organic Pollutants and Concern Over the Link with Insulin Resistance Related Metabolic Diseases. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 238, 69–89. https://doi.org/10.1007/398_2015_5001
- Nurulain, S.M., Ojha, S., Tekes, K., Shafiullah, M., Kalasz, H., Adem, A., 2015. Efficacy of N-Acetylcysteine, Glutathione, and Ascorbic Acid in Acute Toxicity of Paraoxon to Wistar Rats: Survival Study. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 329306. <https://doi.org/10.1155/2015/329306>
- Oh, S.-H., Lim, S.-C., 2006. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 212, 212–223.
- Pal, M., Febbraio, M.A., Lancaster, G.I., 2015. The Roles of c-Jun NH2-Terminal Kinases (JNKs) in Obesity and Insulin Resistance. *J. Physiol.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1113/JP271457>
- Panemangalore, M., Dowla, H.A., Byers, M.E., 1999. Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 72, 84–88. <https://doi.org/10.1007/s004200050342>
- Pearson, J.N., Patel, M., 2016. The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1111/nyas.13115>
- Peng, H.-F., Bao, X.-D., Zhang, Y., Huang, L., Huang, H.-Q., 2015. Identification of differentially expressed proteins of brain tissue in response to methamidophos in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 44, 555–565. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.028>
- Pournourmohammadi, S., Farzami, B., Ostad, S.N., Azizi, E., Abdollahi, M., 2005. Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 191–196.
- Prada, P.O., Zecchin, H.G., Gasparetti, A.L., Torsoni, M.A., Ueno, M., Hirata, A.E., Corezola do Amaral, M.E., Höer, N.F., Boschero, A.C., Saad, M.J.A., 2005. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor

substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146, 1576–1587.

Ramirez-Vargas, M.A., Huerta-Beristain, G., Guzman-Guzman, I.P., Alarcon-Romero, L. del C., Flores-Alfaro, E., Rojas-Garcia, A.E., Moreno-Godinez, M.E., 2017. Methamidophos induces cytotoxicity and oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells. *Environ. Toxicol.* 32, 147–155. <https://doi.org/10.1002/tox.22220>

Saquib, Q., Attia, S.M., Siddiqui, M.A., Aboul-Soud, M.A.M., Al-Khedhairi, A.A., Giesy, J.P., Musarrat, J., 2012. Phorate-induced oxidative stress, DNA damage and transcriptional activation of p53 and caspase genes in male Wistar rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.006>

Sarvas, J.L., Otis, J.S., Khaper, N., Lees, S.J., 2015. Voluntary physical activity prevents insulin resistance in a tissue specific manner. *Physiol. Rep.* 3. <https://doi.org/10.14814/phy2.12277>

Shen, H.-M., Liu, Z., 2006. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 928–939.

Song, D., Hutchings, S., Pang, C.C., 2005. Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 508, 205–210.

Song, M.-Y., Wang, J., Ka, S.-O., Bae, E.J., Park, B.-H., 2016. Insulin secretion impairment in Sirt6 knockout pancreatic β cells is mediated by suppression of the FoxO1-Pdx1-Glut2 pathway. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep30321>

Sun, S.-Y., 2010. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol. Ther.* 9, 109–110.

Taguchi, A., White, M.F., 2008. Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 191–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100533>

Tangvarasittichai, S., 2015. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* 6, 456–480. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>

Wang, C., Chen, K., Xia, Y., Dai, W., Wang, F., Shen, M., Cheng, P., Wang, J., Lu, J., Zhang, Y., 2014. N-acetylcysteine attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and autophagy in mouse liver via regulation of the ROS/JNK/Bcl-2 pathway. *PLoS One* 9, e108855.

Warram, J.H., Martin, B.C., Krolewski, A.S., Soeldner, J.S., Kahn, C.R., 1990. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann. Intern. Med.* 113, 909–915.

White, M.F., 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science* 302, 1710–1711. <https://doi.org/10.1126/science.1092952>

Xu, L.L., Long, C.Y., Wang, J.L., Yu, M., Chen, J.X., 2016. Involvement of oxidative stress in tri-ortho-cresyl phosphate-induced liver injury in male mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 35, 1093–1101. <https://doi.org/10.1177/0960327115621363>

Yan, F., Zhang, J., Zhang, L., Zheng, X., 2016. Mulberry anthocyanin extract regulates glucose metabolism by promotion of glycogen synthesis and reduction of gluconeogenesis in human HepG2 cells. *Food Funct.* 7, 425–433. <https://doi.org/10.1039/c5fo00841g>

Zou, C., Wang, Y., Shen, Z., 2005. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* 64, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.08.001>

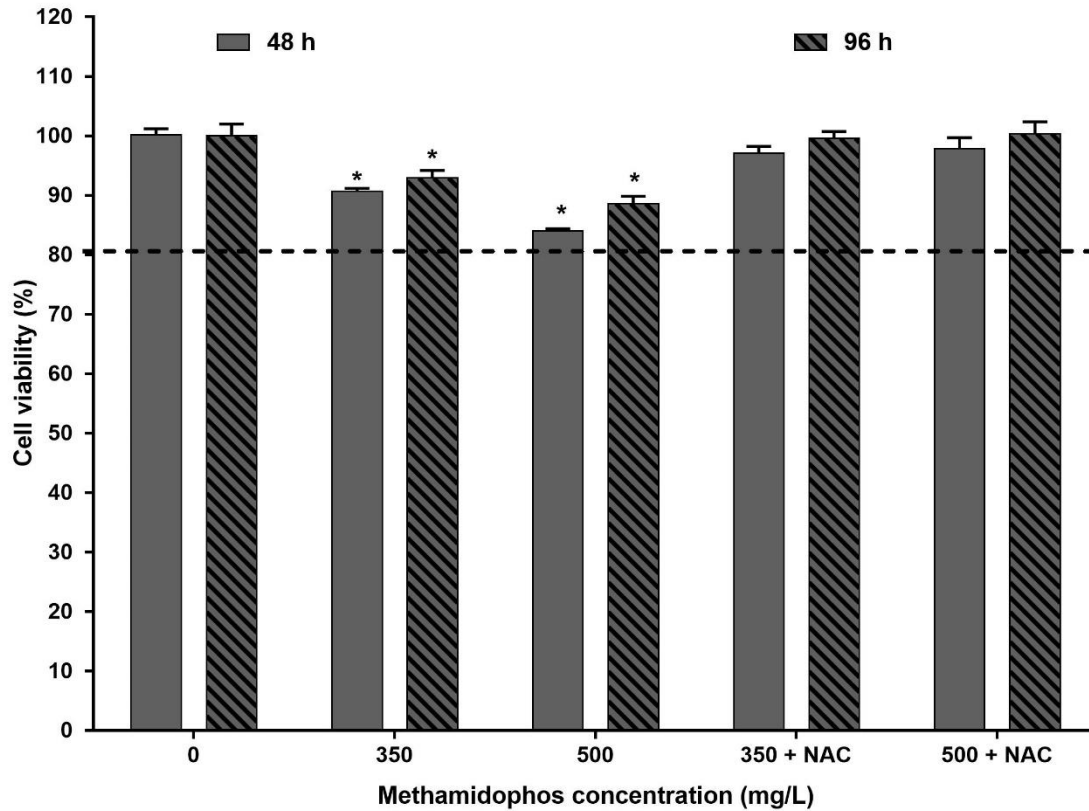


Figura 1. Efecto citotóxico del MET sobre HepG2. HepG2 fueron incubadas con 350 ó 500 mg/L de MET por 48 ó 96 h de exposición, posteriormente el % de viabilidad celular fue determinado por el ensayo de MTT. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). La línea punteada indica el valor referente para un efecto citotóxico. NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

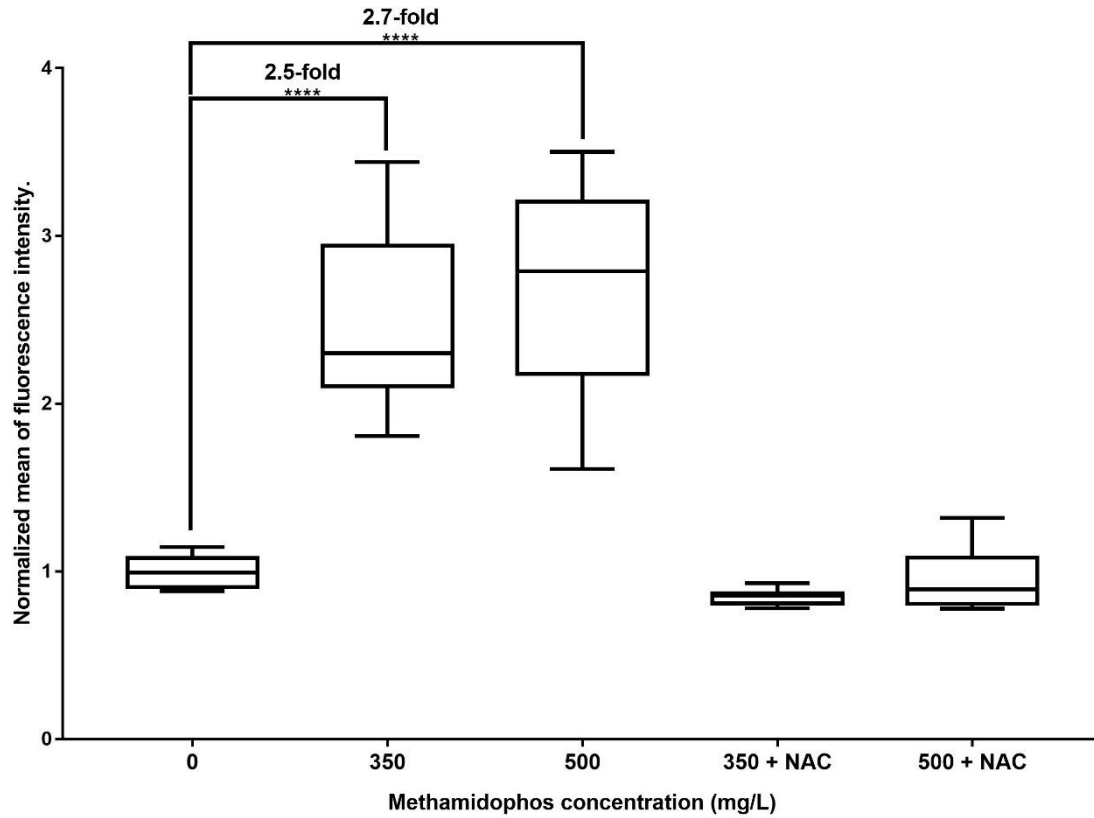


Figura. 3. Efecto del MET sobre la inducción de ROS HepG2. HepG2 fueron incubadas con 350 ó 500 mg/L de MET por 6h de exposición, posteriormente la producción de ROS fue monitoreada. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, “DMSO” (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

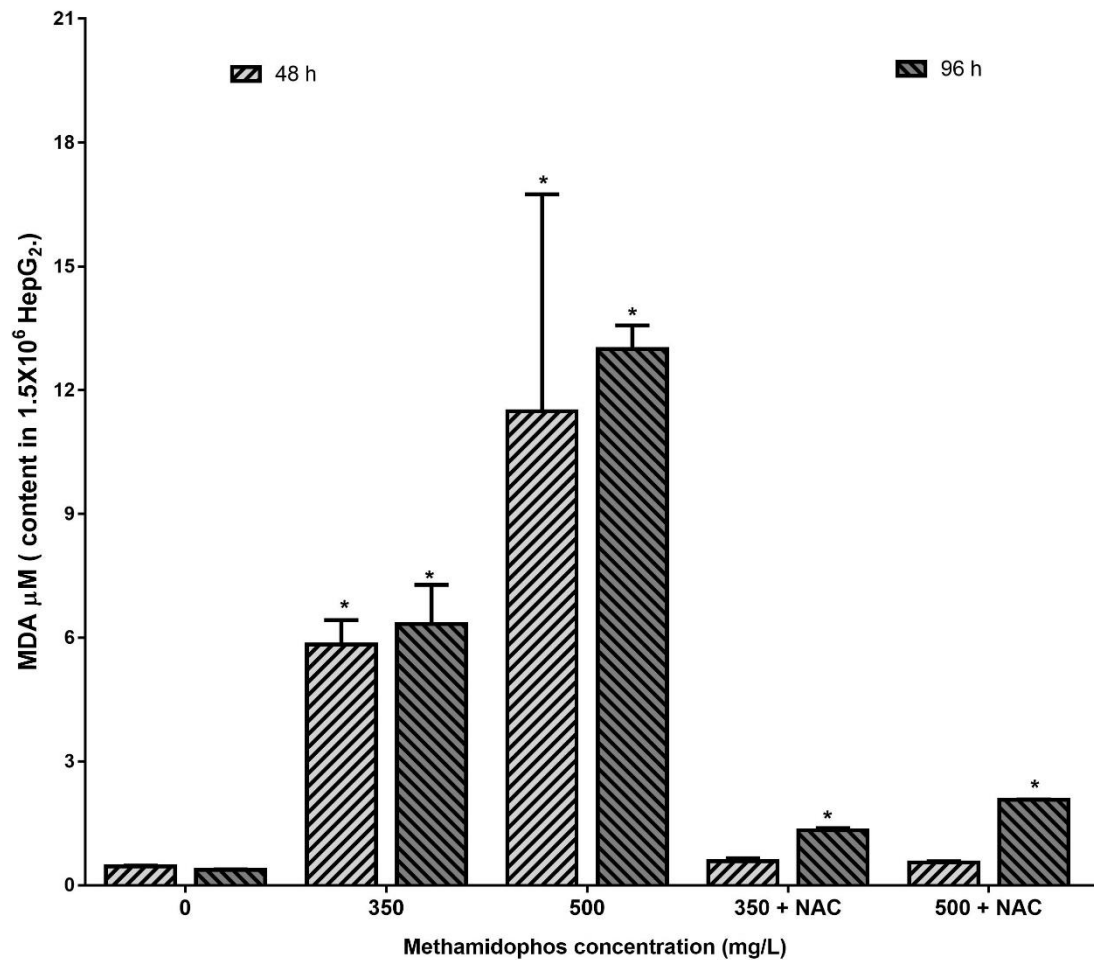


Figura. 3. Efecto del MET sobre la lipoperoxidación en HepG2. HepG2 fueron incubadas con 350 o 500 mg/L de MET a 48 o 96 h de exposición, posteriormente la cantidad de malonaldehído fue estimada. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

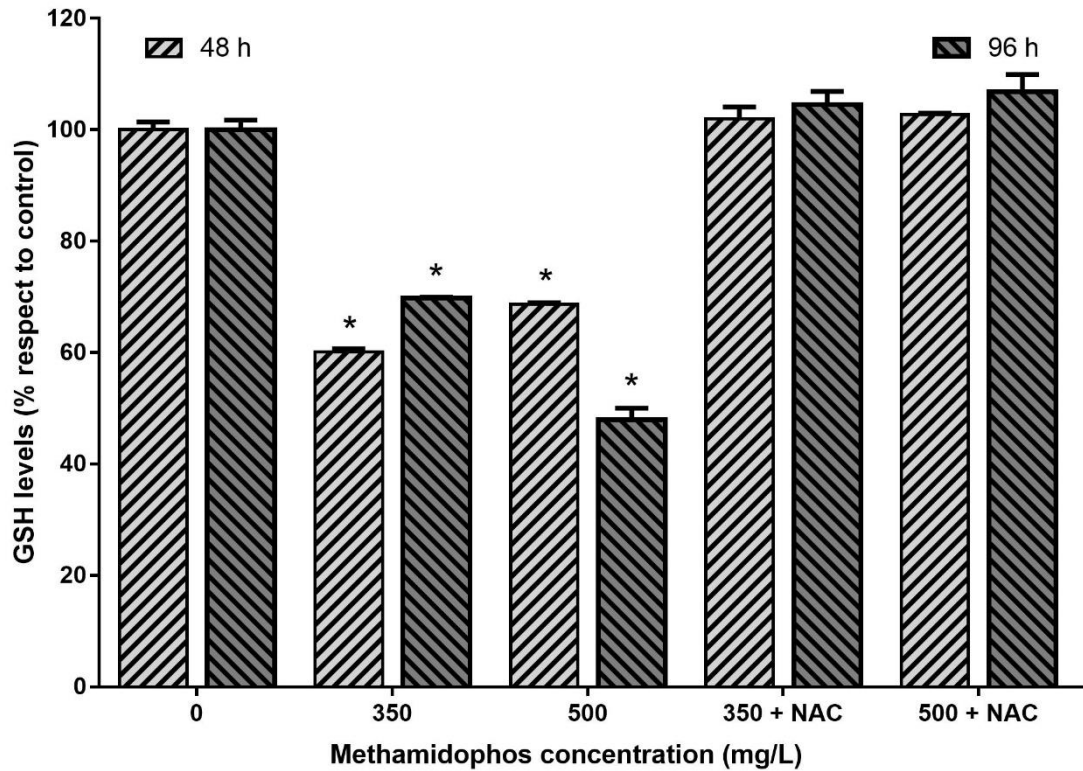


Figura. 4. Efecto del MET sobre los niveles de GSH en HepG2 HepG2 fueron incubadas con 350 o 500 mg/L de MET a 48 o 96 h de exposición, posteriormente la cantidad de GSH fue estimada. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

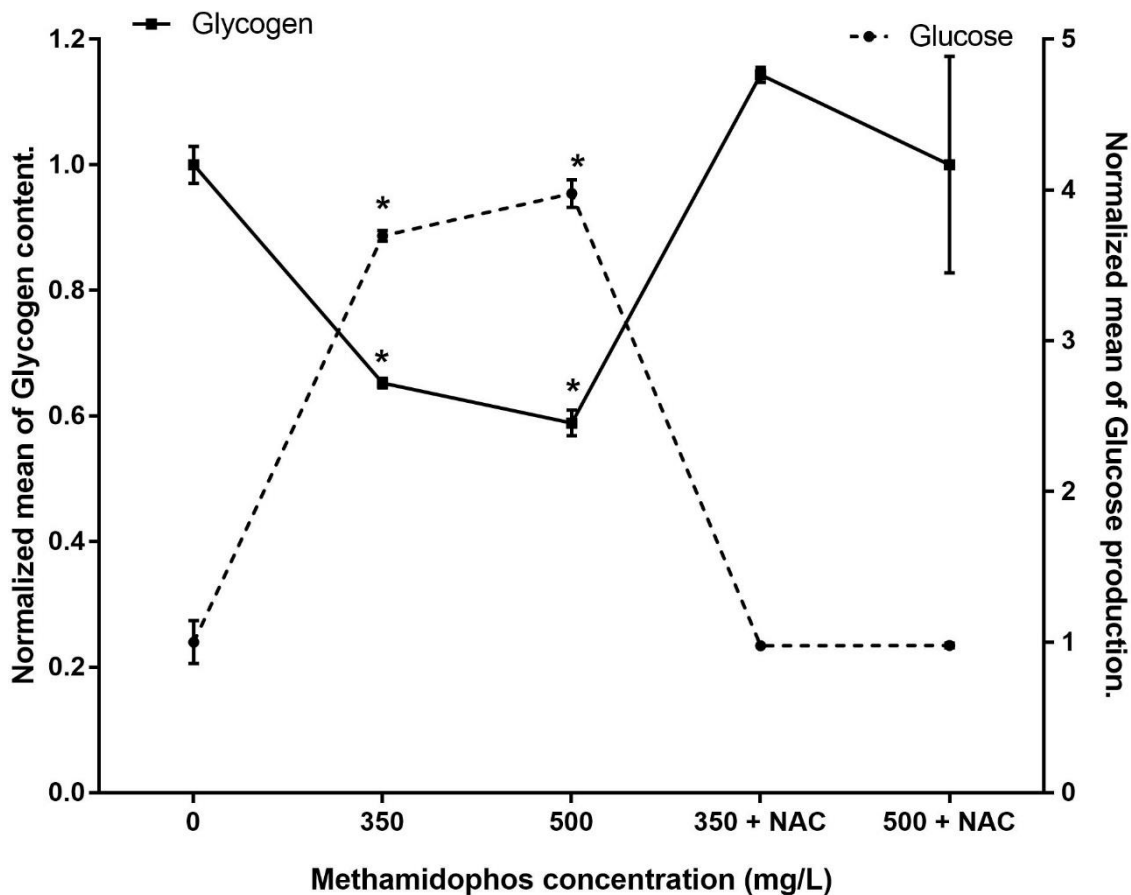


Figura. 5. Efecto del MET sobre la producción de glucosa y niveles de glucógeno HepG2. HepG2 fueron incubadas con 350 o 500 mg/L de MET por 6h, posteriormente los niveles de GSH fueron determinados. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

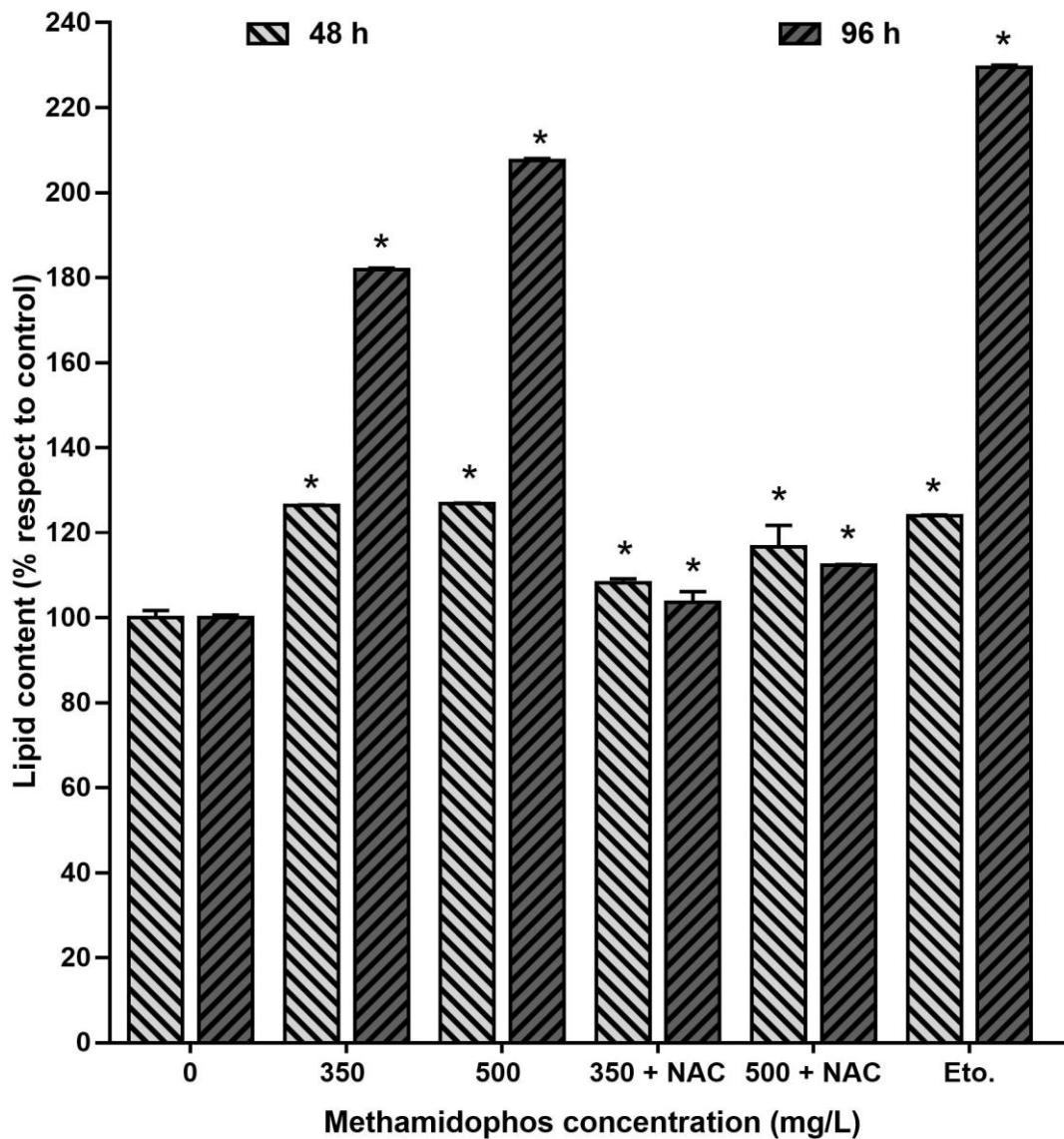


Figura. 6. Efecto del MET sobre la acumulación de lípidos en HepG2. HepG2 fueron incubadas con 350 o 500 mg/L de MET por 48 o 96 h de exposición, posteriormente el contenido de lípidos intracelulares fue determinado. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, “DMSO” (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM). Eto: HepG2 espuestas a 150 nM de Etanol.

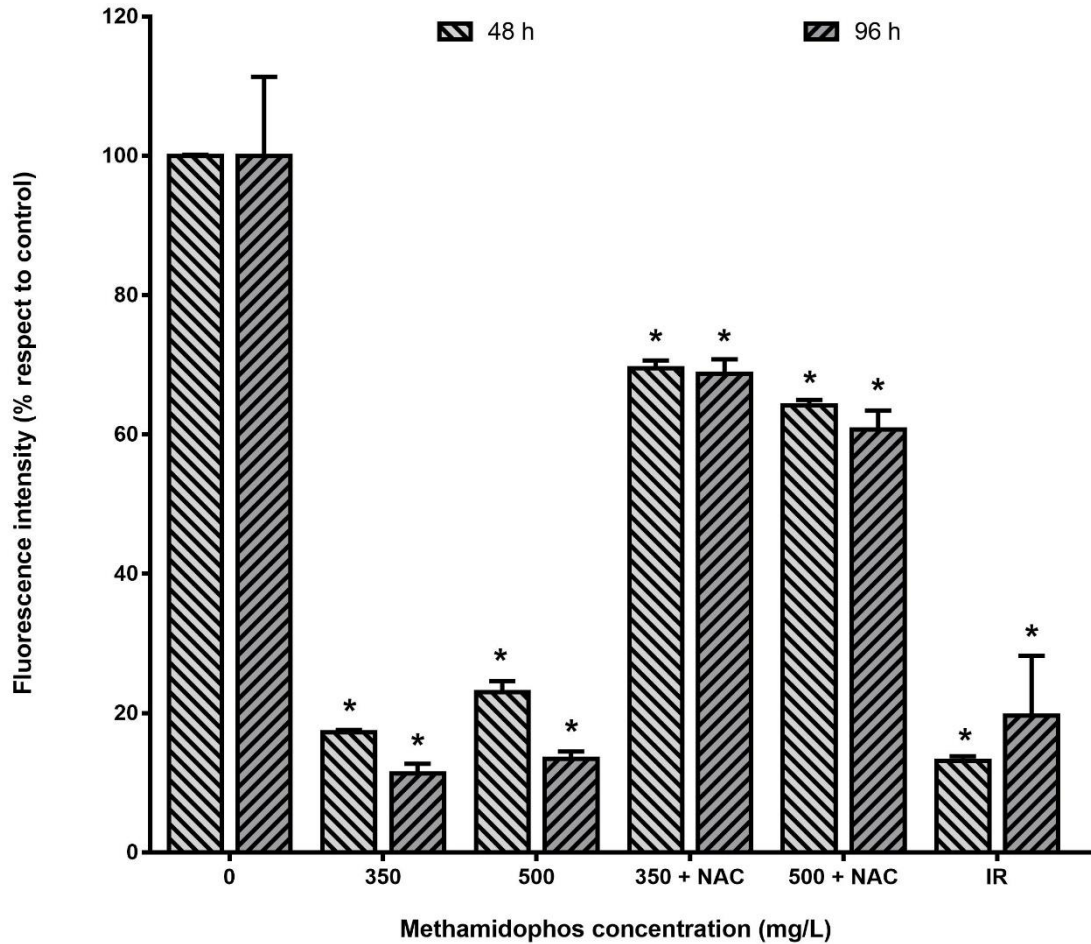


Figura. 7. Efecto del MET sobre la captación de glucosa HepG2. HepG2 fueron incubadas con 350 o 500 mg/L de MET por 48 o 96 h de exposición, posteriormente se indujo la captación de glucosa con 100 nM de insulina. La captación de glucosa fue determinada. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetilcisteína (10 mM). IR: HepG2 insulino resistentes.

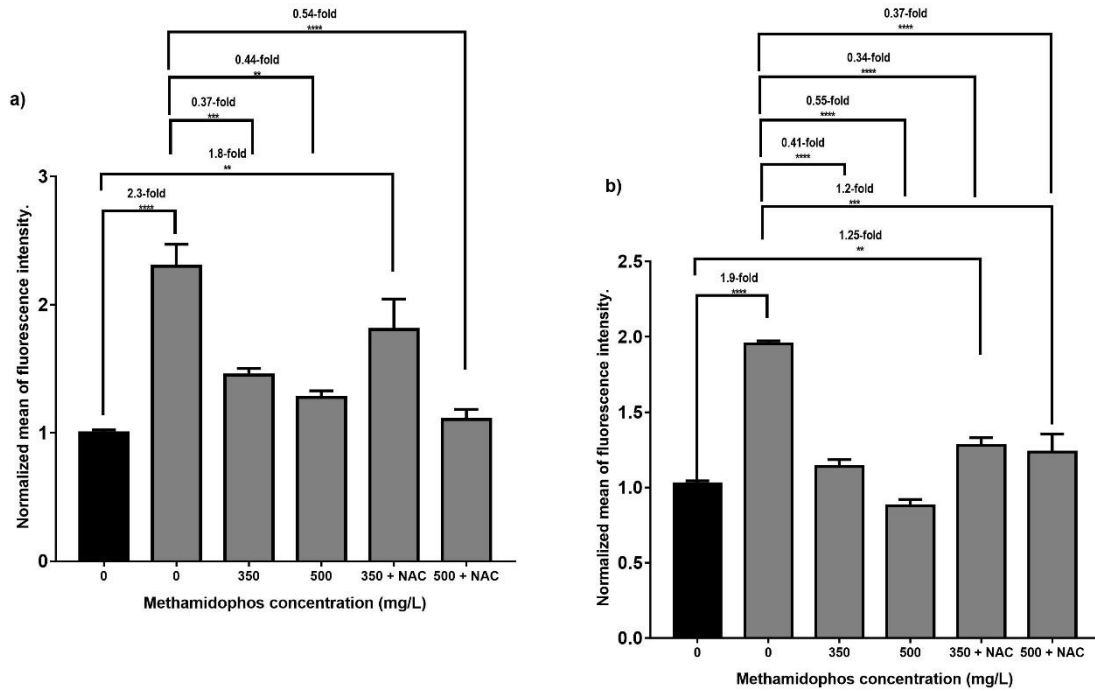


Figura. 8. Efecto del MET sobre la translocación de GLUT4 en HepG2. HepG2 fueron incubadas con 350 o 500 mg/L de MET por 48 h (a) o 96 h (b) de exposición, posteriormente la translocación de GLUT4 fue estimulada con 100 nM de insulina (barras grises), los niveles de GLUT4 fueron determinadas en las células estimuladas y no estimuladas (barras negras). *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, “DMSO” (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

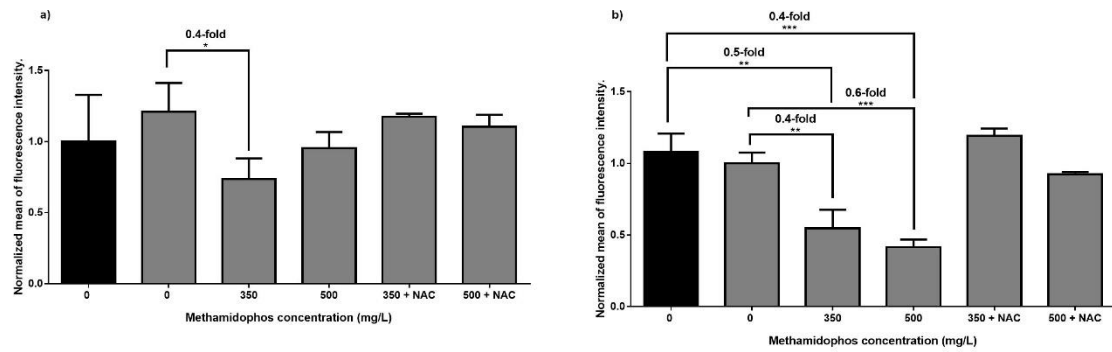


Figura. 9. Efecto del MET sobre los niveles de GLUT2 en HepG2. HepG2 fueron incubadas con 350 o 500 mg/L de MET por 48 h (a) o 96 h (b) de exposición, posteriormente la translocación de GLUT2 fue estimulada con 100 nM de insulina (barras grises), los niveles de GLUT2 fueron determinadas en las células estimuladas y no estimuladas (barras negras). *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

4.- Discusión.

En el presente trabajo se ha evaluado el efecto en la inducción de estrés oxidativo y la resistencia a la insulina inducida por la exposición al metamidofos. De los resultados obtenidos permiten identificar la inducción de resistencia a la insulina a través de la inducción de resistencia a la insulina en nuestro modelo de estudio.

En la primera etapa del estudio se ha determinado los efectos del MET sobre la inducción de resistencia a la insulina, la cual se define como la incapacidad de los tejidos de responder de manera normal a la acción biológica de la insulina (Taguchi and White 2008). Los efectos biológicos observados en modelos animales durante la inducción de resistencia a la insulina tejido específica en el hígado muestran los principales síntomas patofisiológicos observados en pacientes diabéticos como son hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemias e incremento en el contenido lipídico en el hígado (Michael et al. 2000). Condiciones no observadas en modelos de resistencia a insulina específica de músculo (Brüning et al. 1998) o tejido adiposo (Blüher et al. 2002), lo cual sugiere que la inducción hepática a la insulina es el primer evento que desencadena a resistencia a insulina en tejidos periféricos, de ahí a importancia que tiene el estudiar la resistencia hepática a la insulina.

Como se muestra en el capítulo uno la exposición a MET reduce significativamente la captación de glucosa en HepG₂ en respuesta a insulina. La captación de glucosa del medio extracelular es uno de los eventos finales de la vía de PI3K-Akt activada por insulina, el decremento en la captación de glucosa en células tratadas respecto al control sugiere un mecanismo de regulación negativa de la vía de PI3K-Akt (White 2003). Uno de los reguladores negativo de la vía de PI3K-Akt es JNK la cual promueve la degradación de los IRS (Lee et al. 2003a), esta puede ser activada por dietas ricas en grasa (Prada et al. 2005), durante procesos inflamatorios, por la inducción de estrés oxidativo, condiciones observadas en pacientes con obesidad y con resistencia a la insulina (Pal et al. 2015).

Existe gran evidencia que relacionan la inducción de estrés oxidativo con el incremento en la actividad de JNK por la exposición a OP (Caughlan et al. 2004; Shen and Liu 2006; Liu et al. 2010; Ki et al. 2013b; Batista et al. 2016), como se muestra en el capítulo dos, existe evidencia que sugiere la inducción de estrés oxidativo en nuestro modelo celular a inducción de ROS promovería a oxidación de

ASK1 (“apoptosis signal-regulating kinase 1”) el cual se encuentra reprimido por glutatión y por tiolredoxinas que al ser oxidadas por el incremento de ROS se separan de ASK1 exponiendo sitio para su fosforilación una vez fosforilada este puede activar MKK4/7 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4 ó 7) los cuales a su vez pueden activar a JNK. Por otro parte JNK puede ser reprimido directamente por la Glutathione S-transferase π (GST π), la cual puede ser oxidada por el incremento en ROS una vez oxidada pierde su capacidad para reprimir a JNK (Shen and Liu 2006).

Por otra parte, se observó un incremento en el consumo de glucosa en células expuestas a MET sin la estimulación con insulina, este efecto podría ser atribuido a la alta necesidad energética que se requiere para la actividad de los CYP450 durante el metabolismo de los OP (Lukaszewicz-Hussain 2010). Como se mencionó anteriormente HepG2 es una línea de células capaz de inducir el incremento en los CYP450 implicados en el metabolismo de los OP (Westerink and Schoonen 2007), el incremento en la expresión y actividad de los CYP450 se ha implicado como un mecanismo de resistencia a la insulina, la expresión de la isoforma CYP2E1 se asoció con la reducción de la expresión y translocación de GLUT4 (Armoni et al. 2014b). El MET es un OP que puede inducir el incremento de la isoforma CYP2W1 la cual es altamente expresada en hepatocitos humanos (Moscovitz and Aleksunes 2013), por lo cual la inducción de esta isoforma de CYP450 podría asociarse a un decremento en la translocación/funcionalidad de GLUT4 disminuyendo el consumo de glucosa en las células estimuladas con insulina y co-tratadas con MET.

Por otra parte, se determinó el incremento en lípidos intracelulares, el resultado obtenido muestra que el tratamiento con MET incrementa notablemente la cantidad de lípidos intracelulares en forma dosis-tiempo dependiente. El incremento en el contenido lipídico es una de las consecuencias más observadas en personas con resistencia a la insulina o diabetes (Levene and Goldin 2012). El incremento en el contenido lipídico en el hígado se asocia directamente con la inducción de resistencia a la insulina (van Herpen et al. 2011), más que el incremento en lípidos en miocitos (Grunnet et al. 2012). Se propone que el incremento en lípidos en el hígado incrementa la formación de diacilglicerol los cuales incrementan la actividad de PKC un regulador negativo de la vía de PI3K que promueve la degradación de los IRS (Mitra et al. 2008). De esta manera el MET podría inducir la resistencia a la insulina observada en el modelo celular.

Se ha observado que los OP promueven la síntesis *de novo* de lípidos en células hepáticas expuestas, a través de la activación de elementos de respuesta a esteroides. También se ha observado que existe una disminución en la excreción de lípidos sintetizados y un aumento en la captación de lípidos extracelulares (Howell et al. 2016). Siendo esta una de las limitantes de nuestro estudio ya que no se ha determinado el efecto que tiene el MET sobre la excreción de los lípidos en el modelo celular y su acción en sobre la captación de ácidos grasos libres.

En el capítulo dos se investigó la inducción de estrés oxidativo, se observó que existe una resistencia intrínseca del modelo celular a la inducción muerte celular asociada a la exposición a MET (efecto citotóxico). El efecto citotóxico se define como alteraciones bioquímicas, moleculares o estructurales irreversibles que conllevan a la muerte celular (Maines et al. 2001). Otros OP que al igual que el MET son oxones, inducen muerte celular vía apoptosis por la activación de vías mitocondriales que culminan con la liberación del citocromo c y la activación del apoptosoma (Saleh et al. 2003a, b). En células HepG₂ se ha caracterizado a inducción de un complejo entre la procaspasa 3 y p21 el cual promueve la resistencia a la muerte celular inducida por vía mitocondrial (Suzuki et al. 1999), por lo cual esta línea celular podría ser menos susceptible a la muerte celular inducida por OP. Además, se ha caracterizado que HepG₂ es una línea celular con una alta actividad antioxidante lo cual podría proteger a la célula del efecto citotóxico inducido por el estrés oxidativo inducido por el MET (Bai et al. 1999; Alia et al. 2005).

De manera interesante se observó que la disminución en los niveles de glutatión reducido GSH, en estímulos prolongados a 48 y 96 h. Esto se asocia con la aparición de marcador de daño lipoperoxidativo y establece un agotamiento de la defensa antioxidante. Por otra parte la disminución en los niveles de GSH se asocian con la activación de JNK que como se ha mencionado anteriormente es un represor de la vía de PI3K-Akt (Wilhelm et al. 1997). De esta manera podría contribuirse a la inducción de resistencia a la insulina.

En el capítulo 3 evaluamos la participación del estrés oxidativo como un mecanismo de a través del cual el MET podría inducir RI. Para ello utilizamos el antioxidante N-acetil-cisteína. Para ellos las células fueron pretratadas con este antioxidante, de los resultados obtenidos destacan la disminución de las especies reactivas del oxígeno en los cultivos pre tratados con NAC el cual puede ser atribuido a la reacción de ROS con la NAC. La NAC es considerada por su estructura química como un carroñero específico de ROS, esta acción es generada por el grupo

sulfhidrilo de la NAC, el cual se puede reaccionar con OH y formar H₂O disminuyendo el potencial oxidativo de ROS, el resultado de esta reacción es la generación de aniones tóxicos los cuales pueden reaccionar con H₂O₂, formando moléculas más estables y no reactantes (Elbini Dhouib et al. 2016). Además, la NAC promueve la transcripción de elementos de respuesta a antioxidantes (ARE), vía Nrf2 dentro de estos elementos de respuesta se encuentran enzimas antioxidantes como la SOD y CAT las cuales degradan al anión superóxido y al peróxido de hidrógeno respectivamente (Cai et al. 2015). Más estudios son necesarios para elucidar el mecanismo a través del cual la NAC protege de la inducción de ROS durante la exposición a MET.

La disminución de los niveles de ROS podría disminuir la lipoperoxidación y la oxidación del DNA, disminuyendo los niveles de MDA y de genotoxicidad (De Flora et al. 2001), tal como se observó en el presente estudio. Por otra parte, el pre-tratamiento con NAC inhibió la disminución de GSH en HepG2 expuestas a MET, se sabe que NAC es un compuesto que promueve la síntesis de GSH en hepatocitos ya que proporciona la cisteína requerida para la síntesis de GSH (Zafarullah et al. 2003).

El incremento en la producción de glucosa por el hígado así como la disminución del contenido de glucógeno son características asociadas con la inducción de resistencia a la insulina (Birkenfeld and Shulman 2014). En el presente trabajo se observó que la exposición a MET incrementa la producción de glucosa y que esta es asociada con la disminución en los niveles de glucógeno. Esta asociación podría ser atribuida al incremento en la actividad de enzimas asociadas con la glicólisis tales como la glucógeno fosforilasa, o por el incremento en enzimas implicadas en la neoglicogénesis tales como la fosfofructoquinasa, en este sentido se ha demostrado que la exposición de ratas a 200 mg/kg de malatión incrementa la actividad de estas enzimas con la subsecuente disminución del glucógeno (Abdollahi et al. 2004; Pournourmohammadi et al. 2005). Es necesario realizar más estudios del efecto de MET sobre estas enzimas. El efecto protector de la NAC puede ser atribuido a la disminución de la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa que produce la NAC (Manov et al. 2002).

En el presente estudio se observó el incremento en el contenido lipídico de HepG2 expuestas a MET lo cual puede ser atribuido a la síntesis de novo de estas biomoléculas. El uso de NAC disminuyó el incremento en el contenido lipídico, se ha reportado que en ratas expuestas a malatión existe un incremento en el contenido lipídico del hígado y que este fue reversible cuando se utilizó un

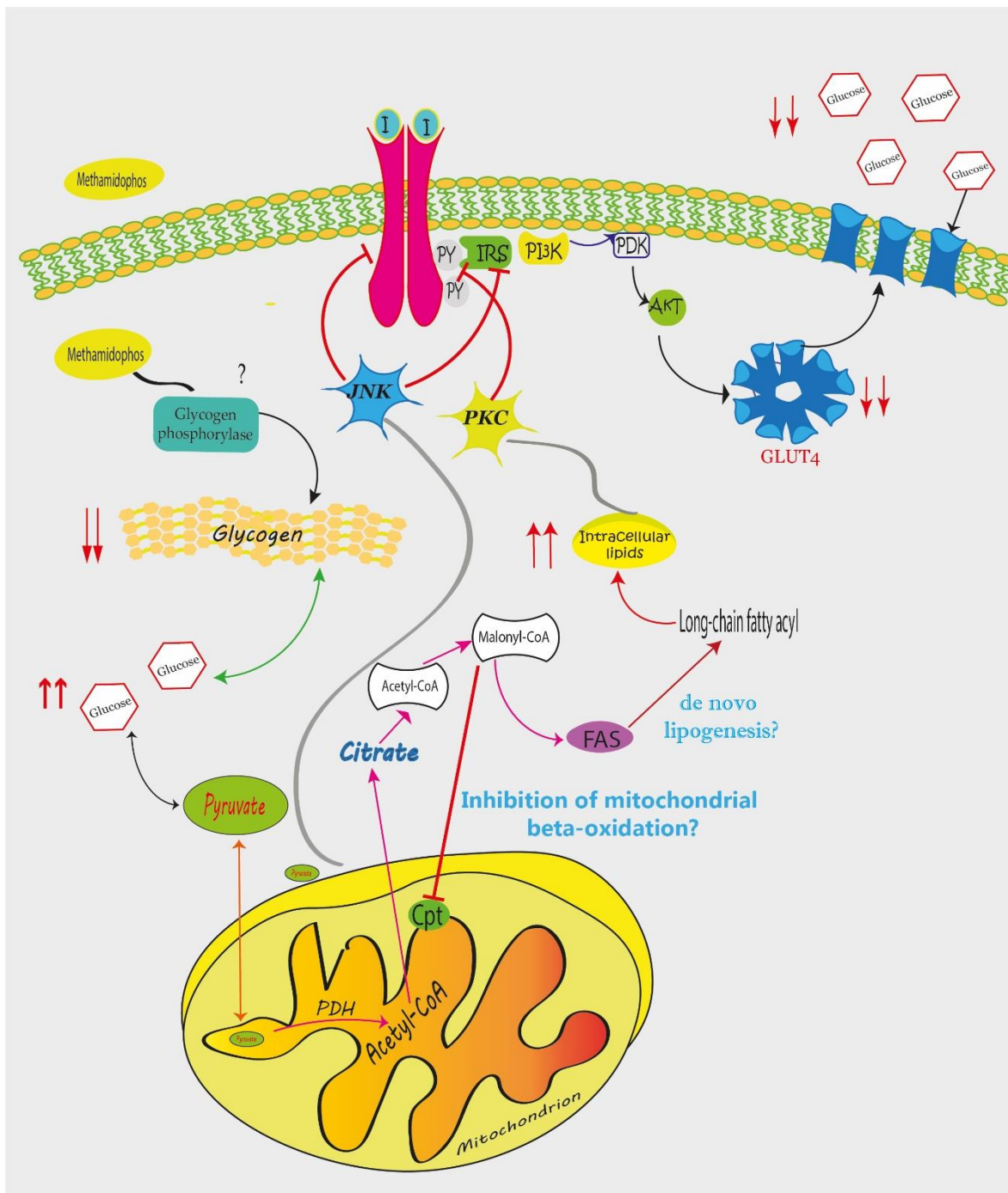
pretratamiento con NAC (Lasram et al. 2014c), se sabe que la NAC disminuye a la glutaraldehido deshidrogenasa enzima implicada en la síntesis de ácidos grasos (Mehta et al. 2002; Calzadilla et al. 2011).

Como se ha mencionado anteriormente existe gran evidencia que relacionan la inducción de estrés oxidativo con el incremento en la actividad de JNK por la exposición a OP (Caughlan et al. 2004; Shen and Liu 2006; Liu et al. 2010; Ki et al. 2013b; Batista et al. 2016), como se mencionó anteriormente la exposición al MET incrementa los niveles de ROS, pudiéndose activar JNK. Sin embargo el uso de NAC incrementa la captación de glucosa en respuesta a insulina, se sabe que NAC disminuye la actividad de JNK al prevenir su activación por las ROS (Wang et al. 2014).

Como se menciona anteriormente la exposición a MET disminuye la translocación de GLUT 4 estimulada por insulina en HepG2, un marcador fuertemente asociado con la inducción de resistencia a la insulina. La disminución en la translocación de GLUT4 estimulada por la insulina podría atribuirse a incremento en la expresión de CYP450. Se conoce que el aumento en la expresión de CYP450 (isoforma CYP2E1) en células L6 derivadas de músculo esquelético conduce a la inhibición de la translocación de GLUT4 estimulada por insulina, se sugieren la activación de NRF2 inhibe la translocación de GLUT4 (Armoni et al. 2014a). Además, se demostró que la inhibición de ROS (por antioxidantes como la vitamina E o N-acetil-1-cisteína) o CYP2E1 (por el clormetiazol, un inhibidor específico de CYP2E1) protege las células de la inhibición de la translocación de GLUT4 estimulada por la insulina. (Armoni et al. 2014), estos datos son concordantes con lo observado en el presente estudio en el cual el pretratamiento de NAC mejora la translocación de GLUT4.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la exposición a MET disminuyó los niveles de GLUT2 en células HepG2. Se conoce que la disminución en los niveles de RNAm y de proteína del GLUT2 es un marcador de resistencia a la insulina en células HepG2 (Aravinthan et al. 2015). Se atribuye estos resultados a la incapacidad de la insulina para fosforilar a Akt; ya que Akt-fosforilada inhibe la acción de FoxO1 un represor de Pdx1 factor que promueve la síntesis de GLUT2 (Song et al. 2016). Por otra parte FoxO1 puede ser activado por JNK, la cual a su vez puede ser activada por ROS, la utilización de NAC podrían disminuir la actividad de JNK la cual no activaría a FoxO1 reduciendo la represión de Pdx1 incrementando los niveles de GLUT2.

A continuación se propone un modelo de integración de la interacción de los mecanismos moleculares asociados a la inducción de resistencia a la insulina inducida por MET.



Modelo integrativo. El papel de la exposición a metamidofos en la inducción de la resistencia a la insulina en HepG2. La exposición a MET reduce los niveles de

glucógeno que podrían estar asociados con el aumento de la actividad de la glucógeno fosforilasa que promueve la glucogenólisis con el posterior aumento en la producción de glucosa. La glucosa puede metabolizarse a través de vías glucolíticas hasta el producto final "piruvato". El piruvato se puede metabolizar en mitocondrias por la piruvato deshidrogenasa (PDH) a acetil coenzima A (acetil-CoA), este proceso es necesario para la síntesis de lípidos. El Acetil-CoA se condensa con oxaloacetato y luego se puede oxidar, este proceso genera citrato. El Citrato se difunde al citoplasma, y es transformado a Acetil-CoA por la ATP-citrato liasa, el Acetil-CoA puede ser carboxilado a malonil coenzima A (Malonil-CoA) por la acetil-CoA carboxilasa. El Malonyl-CoA es un represor de la oxidación de ácidos grasos, a través de la inhibición de la carnitina palmitoiltransferasa (Cpt) I. Además, Malonyl-CoA es un metabolito utilizado por la ácido graso sintetasa (FAS) para aumentar la síntesis de ácidos grasos; el aumento de la síntesis de ácidos grasos y la inhibición de la oxidación de ácidos grasos conducen al aumento del contenido de lípidos intracelulares. El aumento de los ácidos grasos y sus compuestos intermedios, como el diacilglicerol y la ceramida, se ha relacionado con la activación de la proteína quinasa C (PKC); además, el aumento en el metabolismo de la glucosa se asocia con el aumento de ROS con la activación posterior de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK). La PKC y JNK son una serina-quinasa que aumenta la fosforilación de serina en el receptor de insulina y en el sustrato receptor de insulina (IRS). La fosforilación de serina del receptor de insulina y el IRS conduce a su degradación con la regulación negativa de la ruta de PI3k-Akt, lo que reduce la translocación de GLUT4 estimulada por la insulina, dando como resultado una disminución en la captación y el consumo de glucosa.

5.- Referencias.

Abdollahi, M., Donyavi, M., Pournourmohammadi, S., Saadat, M., 2004. Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 137, 343–347.

Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., Goya, L., 2005. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19, 119–128.

Aravinthan, A., Challis, B., Shannon, N., Hoare, M., Heaney, J., Alexander, G.J.M., 2015. Selective insulin resistance in hepatocyte senescence. *Exp. Cell Res.* 331, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.025>

Armoni, M., Harel, C., Ramdas, M., Karnieli, E., 2014a. CYP2E1 Impairs GLUT4 Gene Expression and Function: NRF2 as a Possible Mediator. *Horm. Metab. Res.* 46, 477–483. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363990>

Armoni, M., Harel, C., Ramdas, M., Karnieli, E., 2014b. CYP2E1 Impairs GLUT4 Gene Expression and Function: NRF2 as a Possible Mediator. *Horm. Metab. Res.* 46, 477–483. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363990>

Asante-Appiah, E., Kennedy, B.P., 2003. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E663-670. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00462.2002>

Bai, J., Rodriguez, A.M., Melendez, J.A., Cederbaum, A.I., 1999. Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J. Biol. Chem.* 274, 26217–26224.

Batista, J.E.S., Sousa, L.R., Martins, I.K., Rodrigues, N.R., Posser, T., Franco, J.L., 2016. Data on the phosphorylation of p38MAPK and JNK induced by chlorpyrifos in *Drosophila melanogaster*. *Data Brief* 9, 32–34.

Beurel, E., Grieco, S.F., Jope, R.S., 2015. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol. Ther.* 148, 114–131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>

Birkenfeld, A.L., Shulman, G.I., 2014. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology* 59, 713–723. <https://doi.org/10.1002/hep.26672>

Blüher, M., Michael, M.D., Peroni, O.D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B.B., Kahn, C.R., 2002. Adipose Tissue Selective Insulin Receptor Knockout Protects against Obesity and Obesity-Related Glucose Intolerance. *Dev. Cell* 3, 25–38. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00199-5](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00199-5)

Brüning, J.C., Michael, M.D., Winnay, J.N., Hayashi, T., Hörsch, D., Accili, D., Goodyear, L.J., Kahn, C.R., 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell* 2, 559.

Cahová, M., Vavřínková, H., Kazdová, L., 2007. Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 56, 1–15.

Cai, Z., Lou, Q., Wang, F., Li, E., Sun, J., Fang, H., Xi, J., Ju, L., 2015. N-acetylcysteine protects against liver injury induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 8655–8662.

Calzadilla, P., Sapochnik, D., Cosentino, S., Diz, V., Dixelio, L., Calvo, J.C., Guerra, L.N., 2011. N-acetylcysteine reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 6936–6951.

Caughlan, A., Newhouse, K., Namgung, U., Xia, Z., 2004. Chlorpyrifos Induces Apoptosis in Rat Cortical Neurons that is Regulated by a Balance Between p38 and ERK/JNK MAP Kinases. *Toxicol. Sci.* 78, 125–134. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh038>

Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O'Keefe, J.H., Brand-Miller, J., 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 341–354.

De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Balansky, R.M., 2001. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 22, 999–1013. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.7.999>

Elbini Dhoub, I., Jallouli, M., Annabi, A., Gharbi, N., Elfazaa, S., Lasram, M.M., 2016. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci.* 151, 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.003>

Facchini, F.S., Hua, N., Abbasi, F., Reaven, G.M., 2001. Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3574–3578. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7763>

Grunnet, L.G., Laurila, E., Hansson, O., Almgren, P., Groop, L., Brøns, C., Poulsen, P., Vaag, A., 2012. The triglyceride content in skeletal muscle is associated with hepatic but not peripheral insulin resistance in elderly twins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 4571–4577. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2061>

Guerre-Millo, M., 2004. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 30, 13–19.

Hanley, A.J.G., Williams, K., Stern, M.P., Haffner, S.M., 2002. Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance in Relation to the Incidence of Cardiovascular Disease The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 25, 1177–1184. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.7.1177>

Hansen, L.L., Ikeda, Y., Olsen, G.S., Busch, A.K., Mosthaf, L., 1999. Insulin Signaling Is Inhibited by Micromolar Concentrations of H₂O₂ EVIDENCE FOR A ROLE OF H₂O₂ IN TUMOR NECROSIS FACTOR α -MEDIATED INSULIN RESISTANCE. *J. Biol. Chem.* 274, 25078–25084.

Hectors, T.L.M., Vanparys, C., Van Gaal, L.F., Jorens, P.G., Covaci, A., Blust, R., 2013. Insulin resistance and environmental pollutants: experimental evidence and future perspectives. *Environ. Health Perspect.* 121, 1273–1281. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307082>

Heffetz, D., Rutter, W.J., Zick, Y., 1992. The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. *Biochem J* 288, 631–635.

Howell, G.E., Mulligan, C., Young, D., Kondakala, S., 2016. Exposure to chlorpyrifos increases neutral lipid accumulation with accompanying increased de novo lipogenesis and decreased triglyceride secretion in McArdle-RH7777 hepatoma cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 32, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.002>

Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., Matzaris, M., Brown, S., Mitchell, C.A., 1995. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate is a substrate for the 75 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase and a novel 5-phosphatase which forms a complex with the p85/p110 form of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* 14, 4490–4500.

Kamath, V., Rajini, P.S., 2007. Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication. *Toxicology* 231, 137–146.

Kaneto, H., Xu, G., Fujii, N., Kim, S., Bonner-Weir, S., Weir, G.C., 2002. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J. Biol. Chem.* 277, 30010–30018.

Ki, Y.-W., Park, J.H., Lee, J.E., Shin, I.C., Koh, H.C., 2013. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis. *Toxicol. Lett.* 218, 235–245.

Krüger, J., Brachs, S., Trappiel, M., Kintscher, U., Meyborg, H., Wellenhofer, E., Thöne-Reineke, C., Stawowy, P., Östman, A., Birkenfeld, A.L., Böhmer, F.D., Kappert, K., 2015. Enhanced insulin signaling in density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) knockout mice. *Mol. Metab.* 4, 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.02.001>

Lasram, M.M., Dhouib, I.B., Annabi, A., El Fazaa, S., Gharbi, N., 2014a. A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. *Toxicology* 322, 1–13.

Lasram, M.M., El-Golli, N., Lamine, A.J., Douib, I.B., Bouzid, K., Annabi, A., El Fazaa, S., Abdelmoula, J., Gharbi, N., 2014b. Changes in glucose metabolism and reversion of genes expression in the liver of insulin-resistant rats exposed to malathion. The protective effects of N-acetylcysteine. *Gen. Comp. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.002>

Lee, S.C., Pervaiz, S., 2007. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 497–504.

Lee, Y.H., Giraud, J., Davis, R.J., White, M.F., 2003. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 278, 2896–2902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208359200>

Levene, A.P., Goldin, R.D., 2012. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology* 61, 141–152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04145.x>

Li, J., DeFea, K., Roth, R.A., 1999. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 9351–9356.

Li, J., Pang, Q., 2014. Oxidative Stress-Associated Protein Tyrosine Kinases and Phosphatases in Fanconi Anemia. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 2290–2301.

- Liu, H., Liu, J., Xu, L., Zhou, S., Li, L., Liu, W., 2010. Enantioselective cytotoxicity of isocarbophos is mediated by oxidative stress-induced JNK activation in human hepatocytes. *Toxicology* 276, 115–121.
- Liu, Y.F., Paz, K., Herschkovitz, A., Alt, A., Tennenbaum, T., Sampson, S.R., Ohba, M., Kuroki, T., LeRoith, D., Zick, Y., 2001. Insulin stimulates PKC ζ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 14459–14465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007281200>
- Lukaszewicz-Hussain, A., 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.006>
- Maines, M.D., Costa, L.G., Hodgson, E., Reed, D.J., Sipes, I.G. (Eds.), 2001. *Current Protocols in Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Manov, I., Hirsh, M., Iancu, T.C., 2002. Acetaminophen hepatotoxicity and mechanisms of its protection by N-acetylcysteine: a study of Hep3B cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53, 489–500.
- Matin, M.A., Husain, K., 1987. Cerebral glycogenolysis and glycolysis in malathion-treated hyperglycaemic animals. *Biochem. Pharmacol.* 36, 1815–1817.
- May, J.M., de Haen, C., 1979. The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 254, 9017–9021.
- McKern, N.M., Lawrence, M.C., Streltsov, V.A., Lou, M.-Z., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Elleman, T.C., Richards, K.M., Bentley, J.D., Pilling, P.A., Hoyne, P.A., Cartledge, K.A., Pham, T.M., Lewis, J.L., Sankovich, S.E., Stoichevska, V., Da Silva, E., Robinson, C.P., Frenkel, M.J., Sparrow, L.G., Fernley, R.T., Epa, V.C., Ward, C.W., 2006. Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 443, 218–221. <https://doi.org/10.1038/nature05106>
- Mehta, K., Van Thiel, D.H., Shah, N., Mobarhan, S., 2002. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr. Rev.* 60, 289–293.
- Merat, S., Casanada, F., Sutphin, M., Palinski, W., Reaven, P.D., 1999. Western-Type Diets Induce Insulin Resistance and Hyperinsulinemia in LDL Receptor-Deficient Mice But Do Not Increase Aortic Atherosclerosis Compared With Normoinsulinemic Mice in Which Similar Plasma Cholesterol Levels Are Achieved by a Fructose-Rich Diet. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1223–1230. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.5.1223>
- Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., Kahn, C.R., 2000. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell* 6, 87–97.
- Mittra, S., Bansal, V.S., Bhatnagar, P.K., 2008. From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. *Drug Discov. Today* 13, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.01.006>
- Montgomery, M.P., Kamel, F., Saldana, T.M., Alavanja, M.C.R., Sandler, D.P., 2008. Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993–2003. *Am. J. Epidemiol.* 167, 1235–1246.

Moscovitz, J.E., Aleksunes, L.M., 2013. Establishment of metabolism and transport pathways in the rodent and human fetal liver. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23801–23827.

Mothe, I., Van Obberghen, E., 1996. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J. Biol. Chem.* 271, 11222–11227.

Pal, M., Febbraio, M.A., Lancaster, G.I., 2015. The Roles of c-Jun NH2-Terminal Kinases (JNKs) in Obesity and Insulin Resistance. *J. Physiol.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1113/JP271457>

Pederson, T.M., Kramer, D.L., Rondinone, C.M., 2001. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 50, 24–31.

Pourmouhammad, S., Farzami, B., Ostad, S.N., Azizi, E., Abdollahi, M., 2005. Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 191–196.

Prada, P.O., Zecchin, H.G., Gasparetti, A.L., Torsoni, M.A., Ueno, M., Hirata, A.E., Corezola do Amaral, M.E., Höer, N.F., Boschero, A.C., Saad, M.J.A., 2005. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146, 1576–1587.

Raafat, N., Abass, M.A., Salem, H.M., 2012. Malathion exposure and insulin resistance among a group of farmers in Al-Sharkia governorate. *Clin. Biochem.* 45, 1591–1595.

Rezg, R., Mornagui, B., El-Fazaa, S., Gharbi, N., 2010. Organophosphorus pesticides as food chain contaminants and type 2 diabetes: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 21, 345–357.

Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O.T., Poutout, V., 2004. β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53, S119–S124.

Saldana, T.M., Basso, O., Hoppin, J.A., Baird, D.D., Knott, C., Blair, A., Alavanja, M.C., Sandler, D.P., 2007. Pesticide exposure and self-reported gestational diabetes mellitus in the Agricultural Health Study. *Diabetes Care* 30, 529–534.

Saleh, A. M., Vijayarathy, C., Fernandez-Cabezudo, M., Taleb, M., Petroianu, G., 2003. Influence of paraoxon (POX) and parathion (PAT) on apoptosis: a possible mechanism for toxicity in low-dose exposure. *J. Appl. Toxicol.* 23, 23–29.

Saleh, A M, Vijayarathy, C., Masoud, L., Kumar, L., Shahin, A., Kambal, A., 2003. Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 190, 47–57.

Sánchez-Guerra, M., Pérez-Herrera, N., Quintanilla-Vega, B., 2011. Organophosphorous pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental approaches. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 681–691. <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.602130>

Sarvas, J.L., Otis, J.S., Khaper, N., Lees, S.J., 2015. Voluntary physical activity prevents insulin resistance in a tissue specific manner. *Physiol. Rep.* 3. <https://doi.org/10.14814/phy2.12277>

Sharma, K., Danoff, T.M., DePiero, A., Ziyadeh, F.N., 1995. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by

elevated glucose levels: possible mediation via protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 80–88.

Shen, H.-M., Liu, Z., 2006. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 928–939.

Slotkin, T.A., 2011. Does Early-Life Exposure to Organophosphate Insecticides Lead to Prediabetes and Obesity? *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 31, 297–301. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.012>

Song, M.-Y., Wang, J., Ka, S.-O., Bae, E.J., Park, B.-H., 2016. Insulin secretion impairment in Sirt6 knockout pancreatic β cells is mediated by suppression of the FoxO1-Pdx1-Glut2 pathway. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep30321>

Sugita, H., Fujimoto, M., Yasukawa, T., Shimizu, N., Sugita, M., Yasuhara, S., Martyn, J.J., Kaneki, M., 2005. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 280, 14203–14211.

Suzuki, A., Tsutomi, Y., Yamamoto, N., Shibutani, T., Akahane, K., 1999. Mitochondrial Regulation of Cell Death: Mitochondria Are Essential for Procaspase 3-p21 Complex Formation To Resist Fas-Mediated Cell Death. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3842–3847. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3842>

Taguchi, A., White, M.F., 2008. Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 191–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100533>

Tangvarasittichai, S., 2015. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* 6, 456–480. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>

Teimouri, F., Amirkabirian, N., Esmaily, H., Mohammadirad, A., Aliahmadi, A., Abdollahi, M., 2006. Alteration of hepatic cells glucose metabolism as a non-cholinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative stress. *Hum. Exp. Toxicol.* 25, 697–703.

Thornalley, P., Langborg, A., Minhas, H., 1999. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344, 109–116.

Torres, S.H., De Sanctis, J.B., de Briceno, L.M., Hernandez, N., Finol, H.J., 2004. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J. Endocrinol.* 181, 419–427.

van Herpen, N.A., Schrauwen-Hinderling, V.B., Schaart, G., Mensink, R.P., Schrauwen, P., 2011. Three weeks on a high-fat diet increases intrahepatic lipid accumulation and decreases metabolic flexibility in healthy overweight men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E691-695. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2243>

Vosough-Ghanbari, S., Sayyar, P., Pournourmohammadi, S., Aliahmadi, A., Ostad, S.N., Abdollahi, M., 2007. Stimulation of insulin and glucagon synthesis in rat Langerhans islets by malathion in vitro: Evidence for mitochondrial interaction and involvement of subcellular non-cholinergic mechanisms. *Pestic. Biochem. Physiol.* 89, 130–136.

Wang, C., Chen, K., Xia, Y., Dai, W., Wang, F., Shen, M., Cheng, P., Wang, J., Lu, J., Zhang, Y., 2014. N-acetylcysteine attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and autophagy in mouse liver via regulation of the ROS/JNK/Bcl-2 pathway. *PLoS One* 9, e108855.

Warram, J.H., Martin, B.C., Krolewski, A.S., Soeldner, J.S., Kahn, C.R., 1990. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann. Intern. Med.* 113, 909–915.

Westerink, W.M.A., Schoonen, W.G.E.J., 2007. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 1581–1591. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.05.014>

White, M.F., 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science* 302, 1710–1711. <https://doi.org/10.1126/science.1092952>

Wilhelm, D., Bender, K., Knebel, A., Angel, P., 1997. The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4792–4800. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.8.4792>

Xu, J., Cai, W., Sun, J., Liao, W., Liu, Y., Xiao, J., Zhu, L., Liu, J., Zhang, W., 2015. Serum advanced glycation end products are associated with insulin resistance in male nondiabetic patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath.* 1–7.

Yasukawa, T., Tokunaga, E., Ota, H., Sugita, H., Martyn, J.J., Kaneki, M., 2005. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 280, 7511–7518.

Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003. Molecular mechanisms of *N*-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 6–20. <https://doi.org/10.1007/s000180300001>

Anexo 1

**“Methamidophos Induces Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human
Peripheral Blood Mononuclear Cells”**

Methamidophos Induces Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Marco Antonio Ramirez-Vargas,¹ Gerardo Huerta-Beristain,¹ Iris Paola Guzman-Guzman,² Luz del Carmen Alarcon-Romero,³ Eugenia Flores-Alfaro,³ Aurora Elizabeth Rojas-Garcia,⁴ Ma Elena Moreno-Godinez¹

¹Laboratorio De Toxicologia Y Salud Ambiental. Unidad Academica De Ciencias Quimico Biologicas, Universidad Autonoma De Guerrero, Mexico

²Laboratorio De Investigacion En Obesidad Y Diabetes. Unidad Academica De Ciencias Quimico Biologicas, Universidad Autonoma De Guerrero, Mexico

³Laboratorio De Enfermedades Cronico Degenerativas. Unidad Academica De Ciencias Quimico Biologicas, Mexico, Universidad Autonoma De Guerrero, Mexico

⁴Laboratorio De Contaminacion Y Toxicologia Ambiental. Universidad Autonoma De Nayarit, Mexico

Received 7 November 2014; revised 23 October 2015; accepted 1 November 2015

ABSTRACT: Previous studies have shown that organophosphate pesticide (OP) exposure is associated with oxidative stress. Methamidophos (MET) is an OP widely used in agriculture, which is regarded as a highly toxic pesticide and it is a potent inhibitor of acetylcholinesterase. The aim of this study was to evaluate whether MET can induce oxidative stress at low concentrations in primary cultures of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PBMCs from healthy individuals were exposed to MET (0–80 mg/L) for 0–72 h. We performed the MTT and neutral-red assays to assess the cytotoxicity. As indicators of oxidative stress, the levels of reactive oxygen species (ROS) were assessed using flow cytometry, and the malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels were determined. MET decreased the viability of PBMCs in a dose-dependent manner. At concentrations of 3, 10, or 20 mg/L for 24 h, MET increased the ROS production significantly compared with the vehicle control. Similarly, MET increased the levels of MDA at the same concentrations that increased ROS (10 and 20 mg/L); however, no changes in GSH levels were observed. These results suggest that MET increased the generation of oxidative stress in PBMCs. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. *Environ Toxicol* 32: 147–155, 2015.

Keywords: methamidophos; oxidative stress; reactive oxygen species; malondialdehyde; organophosphate pesticide

INTRODUCTION

Organophosphate pesticides (OP) are widely used around the world (Schreinemachers and Tipraqsa, 2012) to increase

agricultural production and to control vector-borne diseases (Schreinemachers and Tipraqsa, 2012; Ecobichon, 2001). The main target of action for OP is the inhibition of acetylcholinesterase in the central and peripheral nervous systems (Kamanyire and Karalliedde, 2004). However, it has also been postulated that both acute and chronic exposures to these compounds alter the redox processes and thus induce oxidative stress (Lukaszewicz-Hussain, 2010).

Correspondence to: M. E. Moreno-Godinez;

e-mail: emoreno20@hotmail.com

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interest of any type.

Published online 21 November 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/tox.22220

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

The excessive generation of reactive oxygen species (ROS) and reduction in antioxidant defenses cause damage to all vital macromolecules, including lipids, proteins, and DNA (Halliwell and Whiteman, 2004). Epidemiological studies have shown an association between occupational exposure to OP and oxidative stress (Kisby et al., 2009; Rastogi et al., 2009; Muniz et al., 2008; Shadnia et al., 2005). The role of oxidative stress in the induction and development of various diseases, such as cancer (Ahmed, 1999), diabetes (Wei et al., 2009), Alzheimer's, and Parkinson's (Guo et al., 2013) has been reported; these conditions have also been associated with OP exposure (Karami-Mohajeri and Abdollahi, 2011; Parron et al., 2011; Rezg et al., 2010; Waddell et al., 2001). Therefore, it is important to determine whether oxidative stress could be an important mechanism through which OP exert their toxicological effects. In this context, several *in vivo* (Demir et al., 2011; Zama et al., 2007; Fortunato et al., 2006) and *in vitro* (Prins et al., 2014; Edwards et al., 2013; Moore et al., 2010) studies have shown that some OP can induce oxidative stress. However, the information is insufficient for other OP.

Methamidophos (MET; *O*, *S*-dimethyl phosphoramidothiolate) is one of the most widely used OP in the world (FAO, 2011). It is classified as class Ib by the WHO as a highly toxic OP (WHO, 2009) and has been restricted for use and sale in certain countries (USEPA, 2006; UNEP/FAO, 1997). However, its use has increased in developing countries. In Mexico, MET is one of the most widely used pesticides in agriculture (Rojas-Garcia et al., 2011; Schilman et al., 2010; Cortes-Genchi et al., 2008; Perez-Herrera et al., 2008; Recio-Vega et al., 2008). Like other OP, MET exerts its acute toxic effect by inhibiting the activity of the acetylcholinesterase enzyme (Emerick et al., 2012).

Oxidative stress as a mechanism of toxicity associated with exposure to MET has been little studied, although it is known that MET decreases the superoxide dismutase enzyme (Panemangalore and Bebe, 2000) and increases lipid peroxidation (Kalkan et al., 2009). Recently, concentrations of 20 and 40 mg/L of MET have been reported to induce oxidative stress in PC12 cells (Lu et al., 2012). However, the literature is scarce regarding the involvement of oxidative stress in the toxicity induced by low concentrations of MET. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether MET can induce oxidative stress at low concentrations in primary cultures of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Methamidophos, technical grade (purity 97.7%, CAS#: 10265-92-6), was purchased from Sigma-Aldrich (Seelze, GER) and dissolved in DMSO purity 99.9% (Sigma-Aldrich, Fulda, GER), such that the final solvent content was <1% in

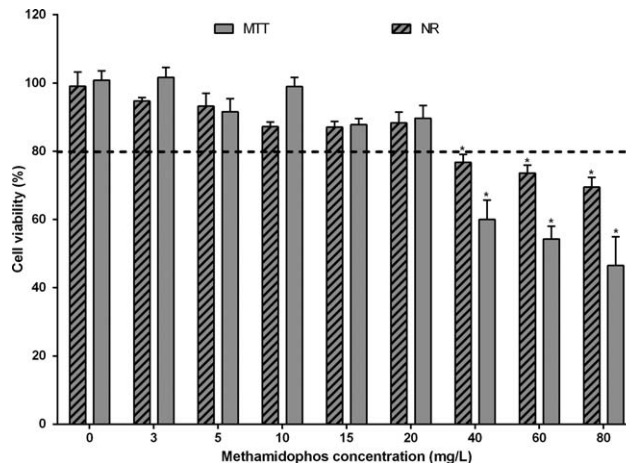


Fig. 1. Effect of MET on PBMCs viability. PBMCs were incubated with various concentrations of MET for 24 h, and the cell viability (%) was determined using the MTT and neutral red uptake assays (NR) *Significant difference ($p < 0.05$) between the cells exposed to MET and the vehicle control "DMSO" (0 mg/L). The dotted line indicates a 20% decrease in cell viability. The data represent the mean and standard error of three independent experiments.

the cell cultures. The concentrations used in this study (3, 10, and 20 mg/L) were selected based on the results of the preliminary cytotoxicity assays (Fig. 1) and because these concentrations (10 and 20 mg/L) were previously used by Lu et al. (2012).

Subjects

Primary cultures of PBMCs from healthy male donors ($n = 10$) between 21 and 25 years of age, with no history of occupational exposure to pesticides, alcohol use, consumption of antioxidant supplements (vitamins), genetic diseases, smoking, or drug use were used. The participation of each subject was voluntary. Informed consent was obtained from the subjects according to the recommendations of the Helsinki declaration.

Cell Culture

Primary cultures of PBMCs were obtained using Ficoll-Hypaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The PBMCs were plated in RPMI-1640 medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 5% fetal bovine serum, 0.2 mM L-glutamine, 1% of nonessential amino acids, and 1% antibiotic/antimycotic (10 units penicillin, streptomycin 0.01 mg, and 0.025 μ g amphotericin B). The incubations were performed at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The PBMCs were stabilized for a period of 24 h before each assay.

Cytotoxicity Assays

Cell viability was measured by assay of quantitative colorimetric neutral red uptake (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) using the conditions proposed by Repetto et al., (2008), and by assay of MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to the protocol proposed for Mosmann (1983). For both assays, the cells were suspended at 250,000 cells/mL and cultured in 96-well plates in a final volume of 200 μ L per well. They were exposed to MET at concentrations of 3, 5, 10, 15, 20, 40, 60, or 80 mg/L for 24 h. The neutral red uptake assay was performed as follows: the medium was removed and 100 μ L of neutral red (40 μ g/mL in RPMI-1640) was added and incubated for 2 h. The dye was removed, and the cells were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4, NaCl 0.138 M, KCl 0.0027 M). Finally, 100 μ L of a solubilizing solution (10 mL deionized water, 10 mL of 96% ethanol, and 0.2 mL of 99.8% glacial acetic acid) was added to each well. The absorbance at 545 nm was measured after 10 min using a Statfax 2100 plate reader (Awareness Technology, Palm City, FL). The MTT assay was performed as follows: the medium was removed and replaced with 50 μ L of MTT (0.5 mg/mL in RPMI 1640) and incubated for 4 h. Then 100 μ L of DMSO was added to each well to dissolve the formazan crystals; after 30 min of shaking, the absorbance was read at 545 nm and corrected at 630 nm by dual wavelength detection. Untreated controls (cells with only culture medium) and vehicle controls (cells with <1% DMSO) were included in each test. The concentrations where the viability was less than or equal to 80% compared with the vehicle control were considered cytotoxic. Three independent experiments were performed in triplicate for each condition. For subsequent experiments, only the noncytotoxic and low concentrations (3, 10, and 20 mg/L of MET) were used.

Measurements of Intracellular ROS Levels

The intracellular production of ROS was determined using the fluorogenic probe CellROX[®] Green (Life Technologies, Eugene, OR), following the manufacturer's specifications. For this experiment, 1.25×10^6 cells/mL in 96-well plates were exposed to MET (3, 10, or 20 mg/L) for 6 h, after which 5 μ M of the CellROX probe was added. After incubation for 30 min, the cells were washed 3 times with PBS and then suspended in 3 mL PBS. The fluorescence at 485/520 nm was determined using an FACS-Canto II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). A total of 100,000 events were acquired for each tested condition, and the analysis was performed using the FACSDIVA V 6.1.3 software (Becton Dickinson). Each condition was evaluated in duplicate in two independent experiments. In each test, untreated controls (cells with only culture medium) and vehicle controls (cells with <1% DMSO) were included.

Lipid Peroxidation Assay

The lipid peroxidation was assessed by measuring malondialdehyde (MDA) levels using the kit "LOP-FR 12[®]" (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI). This assay is based on the reaction of the chromogenic reagent N-methyl-2-phenylindole with MDA at 45°C to yield a stable chromophore. For this assay, samples of 12×10^6 cells/mL (in 24-well plates in a final volume of 500 μ L) were exposed to 3, 10, or 20 mg/L of MET for 24 h. The medium was removed, and the cells were washed 3 times with PBS. The cells were recovered, and 20 μ L of Tris-HCl at 50 mM at pH 7.4 was added, followed by 5 freeze-thaw cycles in a liquid nitrogen/water bath at 45°C. Next, 15 μ L of N-methyl-2-phenylindole and 15 μ L of 12 N hydrochloric acid were added. This mixture was incubated for 1 h at 45°C, and the tubes were then centrifuged at $16872.9 \times g$ for 15 min. The supernatant was recovered, and the absorbance at 586 nm was determined using a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Atlanta, GA). The concentration of MDA was determined from a standard curve. Each condition was analyzed in duplicate in two independent experiments. In each test, untreated controls (cells with only culture medium) and vehicle controls (cells with <1% DMSO) were included.

Reduced Glutathione Assay

The reduced glutathione (GSH) levels were determined using the "Glutathione Assay Kit" (Calbiochem, San Diego, CA). This assay is based on a chemical reaction that carry out in two phases. The first phase leads to the formation of substitution products (thioethers) between the reagent 4-chloro-1-methyl-7-trifluoromethyl-quinolinium methylsulfate, and all mercaptans which are present in the sample. The second phase is a β -elimination reaction that takes place under alkaline conditions, which specifically transforms the substitution product obtained with GSH into a chromophoric thione with a maximal absorbance at 400 nm. For this experiment, 6×10^6 cells/mL (in 24-well plates in a final volume of 500 μ L) were exposed to 3, 10, or 20 mg/L of MET for 6 or 24 h. The medium was removed, and the cells were washed 3 times with PBS. The cells were suspended in 30 μ L of metaphosphoric acid reagent grade solution (Sigma-Aldrich, Fulda, GER) at 5% (W/V in water distillate) and immediately vortexed at 4°C, the lysed cells were then centrifuged at $3000 \times g$ at 4°C for 10 min. The supernatants were recuperated and store at 4°C for 1 h. Next, 60 μ L of potassium phosphate containing diethylenetriamine pentaacetic acid and lubrol were added, after which 5 μ L of 4-chloro-1-methyl-7-trifluoromethyl-quinolinium methylsulfate were added and mixed. Next 5 μ L of 30% NaOH were added and mixed. This mixture was incubated for 10 min at 25°C in the dark, and the absorbance at 400 nm was determined using a Nanodrop 2000c

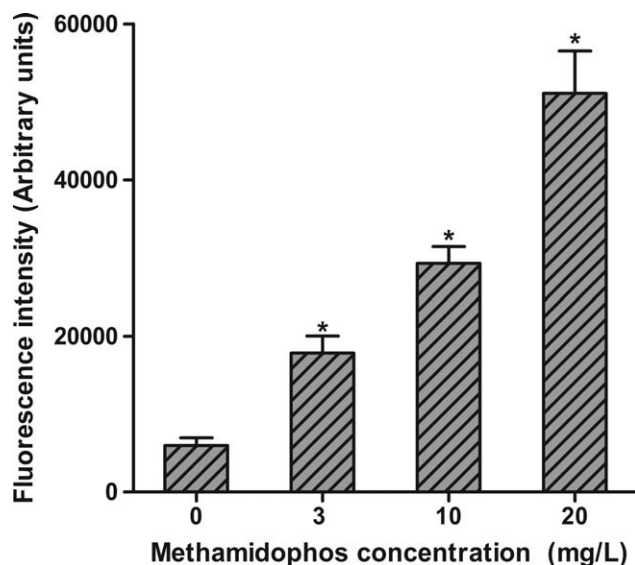


Fig. 2. Effect of MET on ROS production. PBMCs were exposed to various concentrations of MET for 6 h. *Significant difference between the vehicle control “DMSO” (0 mg/L) and the MET-treated cells ($p < 0.05$). The data represent the mean and standard error of two independent experiments.

spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Atlanta, GA). The concentration of GSH was determined from a standard curve. Each condition was analyzed in duplicate in two independent experiments. In each test, untreated controls (cells with only culture medium) and vehicle controls (cells with <1% DMSO) were included.

Statistical Analysis

The statistical analyses were performed using the statistical package STATA version 13.0 (College Station, TX). The results are presented as means and standard errors. Either an ANOVA or Kruskal–Wallis analysis with Dunnett’s *post-hoc* test was used to evaluate the effect of MET on cytotoxicity, ROS, GSH, and MDA generation. Pearson’s correlation coefficient was calculated to evaluate the dose–effect relationship. Linear regression analysis was performed to calculate the lethal concentration fifty (LC50%). The graphs were prepared using the GraphPad 5 program (La Jolla, CA). P -values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Cytotoxicity of Methamidophos

Cell viability evaluated by neutral red and MTT assays showed that MET was cytotoxic at concentrations ≥ 40 mg/L, as indicated by decreases in cell viability of more than 20% compared with the vehicle control ($p < 0.05$). The cell viabil-

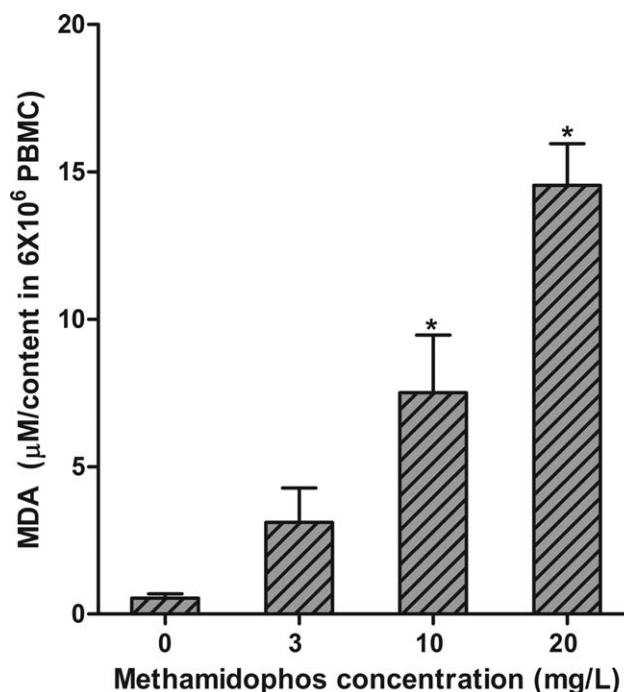


Fig. 3. Effect of MET on MDA generation. PBMCs were exposed to various concentrations of MET for 24 h. *Significant difference between the vehicle control “DMSO” (0 mg/L) and the MET-treated cells ($p < 0.05$). The mean and standard error from two independent experiments are presented.

ity at concentrations > 40 mg/L showed a dose-dependent reduction, as shown in Figure 1. No significant difference between the vehicle and the untreated controls was observed (data not shown). LC50% estimated by neutral red and MTT assays were 128.9 mg/L ($y = -0.34x + 94.41$, $R^2 = 0.92$) and 68 mg/L ($Y = -0.74x + 100.45$, $R^2 = 0.93$), respectively.

Effect of Methamidophos on the Induction of ROS

MET concentrations of 3, 10, or 20 mg/L increased intracellular ROS production in the PBMCs, as shown in Figure 2. The increases compared with the vehicle control were 3-, 4.9-, and 8.6-fold for concentrations of 3, 10, or 20 mg/L, respectively. In addition, the increase was dose-dependent ($R^2 = 0.8$, $p < 0.001$). There was no difference between the ROS levels in the vehicle and untreated controls (data not shown).

Effect of Methamidophos on Lipid Peroxidation

MET increased the levels of MDA 6.2-, 15-, or 29-fold compared with the vehicle control when the cells were exposed to 3, 10, or 20 mg/L for 24 h, respectively. This increase was dose-dependent ($R^2 = 0.77$, $p < 0.001$) (Fig. 3). There was

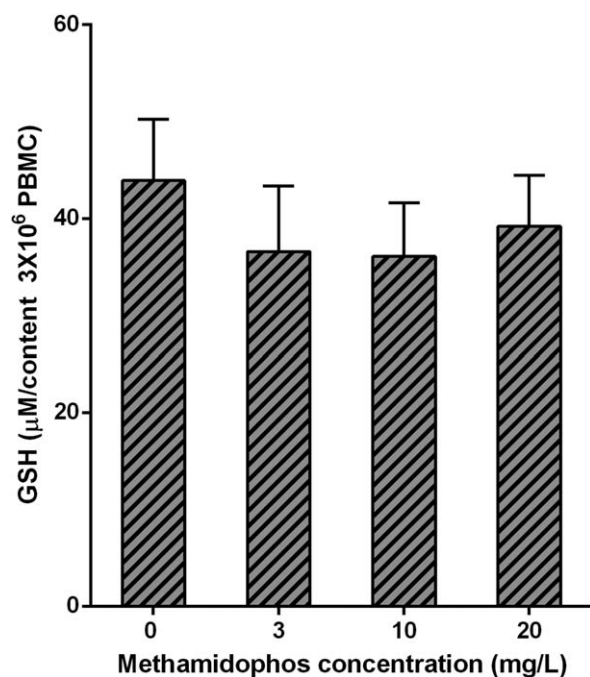


Fig. 4. Effect of MET on GSH levels. PBMCs were exposed to various concentrations of MET for 24 h. The mean and standard error from two independent experiments are presented.

no difference between the ROS levels in the vehicle and untreated controls (data not shown).

Effect of Methamidophos on GSH Levels

MET concentrations of 3, 10, or 20 mg/L decreased the GSH levels for 24 h, 0.17-, 0.18-, and 0.11-fold compared with the vehicle control, respectively (Fig. 4), although that was not statistically significant. There was no difference between the GSH levels in the vehicle and untreated controls (data not shown).

Correlation Between Induction of ROS and Generation of Lipid Peroxidation

As shown in Figure 5, a highly significant correlation ($R^2 = 0.98$, $p < 0.01$) was found between ROS production and MDA generation, suggesting that lipid peroxidation (analyzed 24 h postexposure) is preceded by the increase in ROS production (analyzed 6 h postexposure), and both effects are dose-dependent.

DISCUSSION

Increases in ROS levels with subsequent oxidative damage to DNA, lipids, and proteins is considered as oxidative stress, which can be attributed to various factors including exposure to xenobiotics (Roberts et al., 2009) such as OP (Lukaszewicz-Hussain, 2010). Oxidative stress can alter sev-

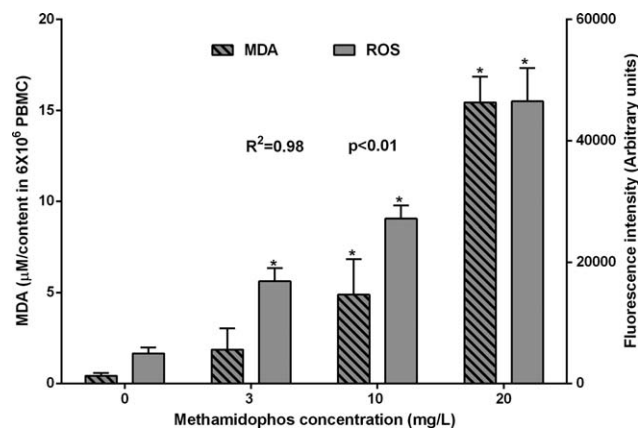


Fig. 5. Correlation between ROS production and lipid peroxidation induced by MET. The data shown are the mean and standard error of two independent experiments.

eral cell signaling pathways that are associated with the initiation, development, and promotion of various diseases (Saeidnia and Abdollahi, 2013). In this study, we investigated whether MET can induce oxidative stress in PBMCs at low concentrations. The results suggest that MET can induce oxidative stress in this model.

This study showed that MET induces cytotoxic effects on PBMCs at concentrations >40 mg/L, and this effect was dose-dependent. The cytotoxic effect of MET was recently studied by Lu et al. (2012), who reported that exposure for 24 h to 80 mg/L of MET in PC12 cells reduced cell viability by more than 20%. Furthermore, Li et al., (2012) showed that exposure of SK-N-SH cells to higher concentrations (500 μg/mL) of MET for 24 h decreased cell viability. These data suggest different susceptibilities as a function of the cell lines used. The PBMCs in our study model were more sensitive than the cells used in previous studies. The difference between the results obtained in the PBMCs and the PC12 and SK-N-SH cell lines may be attributed to an intrinsic resistance to cell death in tumorigenic cells (Indran et al., 2011).

The LC50% estimated by MTT assay was smaller in relation to the estimated by neutral red uptake assay on equal times of exposure. These different profiles have been reported in toxics that deregulate ion channels, these toxics showed LC50% higher estimated by red neutral uptake assay in relationship with MTT assay (Weyermann et al., 2005). Furthermore, this difference while has been observed in toxics that cause damage to organelles (Review in Creppy et al., 2014). In this context, MET downregulated the calcium channel voltage-dependent in SK-N-SH cells at concentration of 500 μg/mL (Li et al., 2012). In addition, recently Peng et al., (2015) have reported that MET induced damage of various organelles in brain tissue of *Paralichthys olivaceus* exposed by 72 or 144 h at 10 mg/L. These data suggest that MET could downregulated ion channels and/or damage intracellular

organelles. More studies are necessary to identify the mechanism of damage to cellular organelles in PBMCs in response to MET.

The consequences of the cytotoxicity of MET (>40 mg/L) have not been characterized. In this regard, MET induced apoptosis in the SK-N-SH cells (Li et al., 2012), suggesting that cytotoxic concentrations of MET may induce apoptosis. This mechanism of cell death has been demonstrated for other OPs (Das et al., 2006), which, like MET, are oxons. For example, paraoxon induces apoptosis through the activation of mitochondrial pathways (Saleh et al., 2003). Thus, the induction of high oxidative stress levels with subsequent mitochondrial dysfunction may be the main trigger of the apoptosis induced by exposure to OP (Karami-Mohajeri and Abdollahi, 2013). However, further studies focused on describing the mechanisms of cell death induced by exposure at ≥ 40 mg/L MET must be performed.

We found that MET concentrations of 3–20 mg/L increased ROS production in the PBMCs compared with the vehicle control, which suggests that MET induces oxidative stress in these cells. This increase in ROS could be due to increases in proinflammatory cytokines such as TNF- α that are induced by MET at concentrations similar to the ones used in this study (25 μ g/mL) (Li et al., 2012). TNF- α activates ROS production in mitochondria by damaging the mitochondrial chain complex III (reviewed in Chen et al., 2008). The increase in ROS found in this study is consistent with the increase reported by Lu et al., (2012) in the range of concentrations from 10 to 40 mg/L; these investigators showed an increase of 1.19-fold in the ROS levels at 40 mg/L.

MET increased MDA generation relative to the vehicle control by 3.1-, 7.5-, and 14.5-fold at concentrations of 3, 10, and 20 mg/L, respectively. The increase in MDA, a product of the lipoperoxidation process used as a biomarker of oxidative stress (Halliwell and Whiteman, 2004), after exposure to OP has been observed *in vivo* studies (Saqib et al., 2012; Zama et al., 2007; Fortunato et al., 2006). Recently, it has been reported that exposure *in vitro* to other OPs, including parathion, methylparathion (Edwards et al., 2013), and malathion (Moore et al., 2010), induces lipid peroxidation in HepG₂ cells. Our results showed that MET, even at noncytotoxic concentrations, increased ROS production, and this increase was correlated with MDA generation, suggesting that the exposure to MET induced oxidative stress in PBMCs. The high correlation between the ROS generation and increased levels of MDA suggests that lipoperoxidation is secondary to the induction of ROS because the methyl groups ($-\text{CH}_2-$) of polyunsaturated fatty acids are major targets of ROS (Siddique et al., 2011). Furthermore, several studies showing DNA damage as a consequence of oxidative stress since the increase in ROS levels generates oxidative damage to DNA (Kisby et al., 2009), while the MDA can induce adducts in DNA (Marnett, 1999). In this context, unpublished data of our research group showed that expo-

sure to MET of PBMCs for 24 or 48 h (3, 10, or 20 mg/L) induces genotoxic damage. Also, this effect has been reported in other cellular models such as PC12 cells (Lu et al., 2012).

Three different mechanisms have been proposed, by which the OP may induce oxidative stress: (1) the overproduction of ROS during the metabolism of the OP (Kashyap et al., 2011), (2) a disturbance of redox cycling in the cells by increasing levels of free radicals, including the superoxide anion (Mishra and Srivastava, 2015), and (3) a decrease in the levels of nonspecific antioxidant systems, including GSH, and specific enzymes such as SOD and CAT (Reviewed in Banerjee et al., 2001). In this context, we observed no significant changes in GSH concentrations of PBMCs in response to MET exposure for 24 h. GSH is the most abundant unspecific antioxidant in the cell, modification in its concentrations are associated with changes in antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase (GPx) (reviewed in Tew and Townsend, 2012). Reduction of GSH levels in PBMCs is associated with cell death induction independent of ROS induction (Franco et al., 2007). The decrease in GSH levels determined in this study was similar to reports in PC12 cells exposed to MET for 24 h; in this model, a decrease of GSH levels of 0.12- and 0.20-fold for concentrations of 20 or 40 mg/L, respectively, was observed (Lu et al., 2012). The insignificant reduction in GSH levels has been reported in PBMCs exposed for 24 h to low and noncytotoxic concentrations of malathion (5, 10, or 20 μ M); also it was observed that the exposure to cytotoxic concentrations (50 or 100 μ M) decreased the GSH levels. The GSH levels were associated with changes in the heat shock protein 27 (HSP27) levels. These data showed that at low concentrations (5–20 μ M), HSP27 levels increased in PBMCs and decreased at high concentrations (50 or 100 μ M). The authors suggested that induction of HSP27 at low dosage (5–20 μ M) is a mechanism by which PBMCs are protected of GSH depletion; however, the exposure to high concentrations of malathion resulted in no significant increase in HSP27 leads to GSH depletion, and massive cell death (Ahmed et al., 2009). More studies are necessary for evidentiary the role of HSP27 in the protection of GSH levels as a mechanism cytoprotective of PBMCs in response to exposure to MET.

The MET concentrations used in this study were 3, 10, and 20 mg/L, which are equivalent to 0.0213, 0.071, and 0.142 mM, respectively. These concentrations have been reported to decrease the activity of acetylcholinesterase (AChE) and neuropathy target esterase (NTE) (Emerick et al., 2012; Bertolazzi et al., 1991) by <5%. In addition, this low percentage of inhibition is not associated with the presence of symptoms of acute poisoning, in which there is a reduction of 80% AChE activity (OP-acute cholinergic syndrome) or a reduction of 77% of NTE (OP-induced delayed neuropathy) (McConnell et al., 1999). Additionally, it has been reported that the levels of absorbed MET may

reach concentrations of 10–20 mg/L in workers involved in spraying/mixing activities that used MET (based on a 5-h workday) (Lonsway et al., 1997).

The data obtained in this study suggest that low- and non-cytotoxic concentrations of MET are capable of increasing ROS production and MDA generation in PBMCs. These data are consistent with the induction of oxidative stress without effects on cell viability. However, additional studies focused on determining the cytoprotective mechanism developed in oxidative stress induction by MET are necessary.

REFERENCES

- Ahmed FE. 1999. The role of oxidative stress in environmental carcinogenesis. *J Environ Sci Heal Part C* 17:111–142.
- Ahmed T, Tripathi AK, Suke SG, Kumar V, Ahmed RS, Das S, Banerjee BD. 2009. Role of HSP27 and reduced glutathione in modulating malathion-induced apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells: Ameliorating effect of N-acetylcysteine and curcumin. *Toxicol in Vitro* 23:1319–1325.
- Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. 2001. Pesticide-induced oxidative stress: Perspective and trends. *Rev Environ Health* 16:1–40.
- Bertolazzi M, Caroldi S, Moretto A, Lotti M. 1991. Interaction of methamidophos with hen and human acetylcholinesterase and neuropathy target esterase. *Arch Toxicol* 65:580–585.
- Chen X, Andresen BT, Hill M, Zhang J, Booth F, Zhang C. 2008. Role of reactive oxygen species in tumor necrosis factor- α induced endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rev* 4: 245–255.
- Cortes-Genchi P, Villegas-Arrizon A, Aguilar-Madrid G, Del Pilar Paz-Roman M, Maruris-Reducindo M, Juarez-Perez CA. 2008. Symptom prevalence and pesticide management on agricultural workers. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 46:145–152.
- Creppy EE, Diallo A, Moukha S, Eklu-Gadegbeku C, Cros D. 2014. Study of epigenetic properties of poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride (PHMB). *Int J Environ Res Public Health* 11:8069–8092.
- Das GP, Pasha AS, Jamil K. 2006. Estimation of apoptosis and necrosis caused by pesticides *in vitro* on human lymphocytes using DNA diffusion assay. *Drug Chem Toxicol* 29:147–156.
- Demir F, Uzun FG, Durak D, Kalender Y. 2011. Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of catechin and quercetin. *Pestic Biochem Physiol* 99:77–81.
- Ecobichon DJ. 2001. Pesticide use in developing countries. *Toxicology* 160:27–33.
- Edwards FL, Yedjou CG, Tchounwou PB. 2013. Involvement of oxidative stress in methyl parathion and parathion-induced toxicity and genotoxicity to human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ Toxicol* 28:342–348.
- Emerick GL, DeOliveira GH, Oliveira RV, Ehrlich M. 2012. Comparative *in vitro* study of the inhibition of human and hen esterases by methamidophos enantiomers. *Toxicology* 292: 145–150.
- FAO. 2011. Food and Agriculture Organization. FAOSTAT Database on Resources. FAO Statistics Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/> Accessed 10-28-14.
- Franco R, Panayiotidis MI, Cidlowski JA. 2007. Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. *J Biol Chem* 282: 30452–30465.
- Fortunato JJ, Agostinho FR, REus GZ, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. 2006. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotox Res* 9:23–28.
- Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. 2013. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 8:2003–2014.
- Halliwell B, Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Brit J Pharmacol* 142:231–255.
- Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta BBA Bioenerg* 1807:735–745.
- Kalkan S, Ozdemir D, Ergur BU, Hazardin NU, Akgun A, Topcu A, Kaplan YC, Hocaoglu N, Oransay K, Tuncok Y. 2009. Protective effect of an adenosine A₁ receptor agonist against metamidophos-induced toxicity and brain oxidative stress. *Toxicol Mech Methods* 19:148–153.
- Kamanyire R, Karalliedde L. 2004. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup Med* 54:69–75.
- Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. 2011. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. *Hum Exp Toxicol* 30:1119–1140.
- Karami-Mohajeri S, Abdollahi M. 2013. Mitochondrial dysfunction and organophosphorus compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 270:39–44.
- Kashyap MP, Singh AK, Kumar V, Tripathi VK, Srivastava RK, Agrawal M, Khanna VK, Yadav S, Jain SK, Pant AB. 2011. Monocrotophos induced apoptosis in PC12 cells: Role of xenobiotic metabolizing cytochrome P450s. *PLoS ONE* 6: e17757.
- Kisby GE, Muniz JF, Scherer J, Lasarev MR, Koshy M, Kow YW, McCauley L. 2009. Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers. *J Agromedicine* 14:206–214.
- Li T, Zhao H, Hung G-C, Han J, Tsai S, Li B, Zhang J, Puri RK, Lo S-C. 2012. Differentially expressed genes and pathways induced by organophosphates in human neuroblastoma cells. *Exp Biol Med* 237:1413–1423.
- Lonsway JA, Byers ME, Dowla HA, Panemangalore M, Antonious GF. 1997. Dermal and respiratory exposure of mixers/sprayers to acephate, methamidophos, and endosulfan during tobacco production. *Bull Environ Contam Toxicol* 59: 179–186.
- Lu XT, Ma Y, Wang C, Zhang XF, Jin DQ, Huang CJ. 2012. Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *J Environ Sci Health B* 47:445–454.

- Lukaszewicz-Hussain A. 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pestic Biochem Physiol* 98:145–150.
- Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 424:83–95.
- McConnell R, Delgado-Tellez E, Cuadra R, Torres E, Keifer M, Almendarez J, Miranda J, El-Fawal HAN, Wolff M, Simpson D, Lundberg I. 1999. Organophosphate neuropathy due to methamidophos: Biochemical and neurophysiological markers. *Arch Toxicol* 73:296–300.
- Mishra V, Srivastava N. 2015. Organophosphate pesticides-induced changes in the redox status of rat tissues and protective effects of antioxidant vitamins. *Environ Toxicol* 30:472–482.
- Moore PD, Yedjou CG, Tchounwou PB. 2010. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ Toxicol* 25:221–226.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.
- Muniz JF, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow YW, Nazar-Stewart V, Kisby GE. 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol* 227:97–107.
- Panemangalore M, Bebe FN. 2000. Dermal exposure to pesticides modifies antioxidant enzymes in tissues of rats. *J Environ Sci Heal Part B* 35:399–416.
- Parron T, Requena M, Hernandez AF, Alarcon R. 2011. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* 256:379–385.
- Peng H-F, Bao X-D, Zhang Y, Huang L, Huang H-Q. 2015. Identification of differentially expressed proteins of brain tissue in response to methamidophos in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol* 44:555–565.
- Perez-Herrera N, Polanco-Minaya H, Salazar-Arredondo E, Solis-Heredia MJ, Hernandez-Ochoa I, Rojas-Garcia E, Alvarado-Mejia J, Borja-Aburto VH, Quintanilla-Vega B. 2008. PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorus pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol* 230:261–268.
- Prins JM, Chao C-K, Jacobson SM, Thompson CM, George KM. 2014. Oxidative stress resulting from exposure of a human salivary gland cells to paraoxon: An *in vitro* model for organophosphate oral exposure. *Toxicol in Vitro* 28:715–721.
- Rastogi SK, Satyanarayan PVV, Ravishankar D, Tripathi S. 2009. A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying. *Indian J Occup Environ Med* 13:131–134.
- Recio-Vega R, Ocampo-Gomez G, Borja-Aburto VH, Moran -Martinez J, Cebrian-Garcia ME. 2008. Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality: Association between sperm parameters and urinary pesticide levels. *J Appl Toxicol* 28:674–680.
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 3:1125–1131.
- Rezg R, Mornagui B, El-Fazaa S, Gharbi N. 2010. Organophosphorus pesticides as food chain contaminants and type 2 diabetes: A review. *Trends Food Sci Technol* 21:345–357.
- Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EMG, Doorn JA, Slikker W. 2009. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci off J Soc Toxicol* 112:4–16.
- Rojas-Garcia AE, Medina-Diaz IM, Robledo-Marengo M, de L, Barron-Vivanco BS, Giron-Perez MI, Velazquez-Fernandez JB, Gonzalez-Arias CA, Albores-Medina A, Quintanilla-Vega B, Ostrosky-Wegman P, Rojas-Garcia MC, Perez-Herrera NE, Lopez-Flores JF. 2011. Hematological, biochemical effects, and self-reported symptoms in pesticide retailers. *J Occup Environ Med Am Coll Occup Environ Med* 53:517–521.
- Saeidnia S, Abdollahi M. 2013. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* 273:442–455.
- Saleh AM, Vijayarathay C, Fernandez-Cabezudo M, Taleb M, Petroianu G. 2003. Influence of paraoxon (POX) and parathion (PAT) on apoptosis: A possible mechanism for toxicity in low-dose exposure. *J Appl Toxicol* 23:23–29.
- Saquib Q, Attia SM, Siddiqui MA, Aboul-Soud MAM, Al-Khedhairy AA, Giesy JP, Musarrat J. 2012. Phorate-induced oxidative stress, DNA damage and transcriptional activation of p53 and caspase genes in male Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 259:54–65.
- Schilman A, Lacasana M, Blanco-Munoz J, Aguilar-Garduno C, Salinas-Rodriguez A, Flores-Aldana M, Cebrian ME. 2010. Identifying pesticide use patterns among flower growers to assess occupational exposure to mixtures. *Occup Environ Med* 67:323–329.
- Schreinemachers P, Tipraqsa P. 2012. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy* 37:616–626.
- Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, Jalali N, Abdollahi M. 2005. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol* 24:439–445.
- Siddique YH, Ara G, Afzal M. 2011. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose Response* 10:1–10.
- Tew KD, Townsend DM. 2012. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxidants Redox Signal* 17:1728–1737.
- UNEP/FAO. 1997. United Nations Environment Programme/ Food and Agriculture Organization. Decision Guidance Documents: Methamidophos - Methyl parathion - Monocrotophos - Parathion - Phosphamidon. Operation of the PIC procedure for pesticides included because of their acute hazard classification and concern as to their impact on human health under conditions of use in developing countries. Joint FAO/UNEP programme for the operation of Prior Informed Consent (PIC) (Rome-Geneva) <http://www.fao.org/docrep/w5715e/w5715e02.htm#methamidophos>. Accessed 10-28-14.

- USEPA. 2006. U. S. Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision for Methamidophos. Washinton, DC.
- Waddell BL, Zahm SH, Baris D, Weisenburger DD, Holmes F, Burmeister LF, Cantor KP, Blair A. 2001. Agricultural use of organophosphate pesticides and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among male farmers (United States). *Cancer Causes Control* 12:509–517.
- Wei W, Liu Q, Tan Y, Liu L, Li X, Cai L. 2009. Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. *Hemoglobin* 33: 370–377.
- Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm* 288:369–376.
- WHO. 2009. World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, Geneva.
- Zama D, Meraihi Z, Tebibel S, Benayssa W, Benayache F, Benayache S, Vlietinck A. 2007. Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: The protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. *Indian J Pharmacol* 39:145–150.

Anexo 2

Effects of exposure to malathion on blood glucose concentration: a meta-analysis



Effects of exposure to malathion on blood glucose concentration: a meta-analysis

Marco Antonio Ramirez-Vargas¹ · Eugenia Flores-Alfaro² · Mayrut Uriostegui-Acosta³ · Patricia Alvarez-Fitz¹ · Isela Parra-Rojas⁴ · Ma. Elena Moreno-Godínez¹ 

Received: 16 May 2017 / Accepted: 29 November 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

Abstract

Exposure to malathion (an organophosphate pesticide widely used around the world) has been associated with alterations in blood glucose concentration in animal models. However, the results are inconsistent. The aim of this meta-analysis was to evaluate whether malathion exposure can disturb the concentrations of blood glucose in exposed rats. We performed a literature search of online databases including PubMed, EBSCO, and Google Scholar and reviewed original articles that analyzed the relation between malathion exposure and glucose levels in animal models. The selection of articles was based on inclusion and exclusion criteria. The database search identified thirty-five possible articles, but only eight fulfilled our inclusion criteria, and these studies were included in the meta-analysis. The effect of malathion on blood glucose concentration showed a non-monotonic dose-response curve. In addition, pooled analysis showed that blood glucose concentrations were 3.3-fold higher in exposed rats than in the control group (95% CI, 2–5; $Z = 3.9$; $p < 0.0001$) in a random-effect model. This result suggested that alteration of glucose homeostasis is a possible mechanism of toxicity associated with exposure to malathion.

Keywords Malathion · Organophosphate pesticides · Hyperglycemia · Animal models

Introduction

Disruption of energetic metabolism has been considered a mechanism through which organophosphate pesticides (OP) exert their toxicological effects (Romero-Navarro et al. 2006;

Basiri et al. 2007; Karami-Mohajeri and Abdollahi 2011; Lasram et al. 2015b; Mostafalou and Abdollahi 2016). Malathion (diethyl (dimethoxyphosphinothioylthio) succinate) is a broad-spectrum OP classified by the World Health Organization as a slightly hazardous pesticide, and this OP is used widely in agriculture and brigades to control vector-borne diseases (WHO 2010). The neurotoxic effects induced by exposure to malathion are caused by the inhibition of acetylcholinesterase in the central and peripheral nervous systems (Karami-Mohajeri and Abdollahi 2011; Karami-Mohajeri et al. 2014; Fakhri-Bafghi et al. 2016).

In addition, acute, subchronic, or chronic exposure to malathion has been associated with metabolic perturbations in exposed populations (Namba 1971; Raafat et al. 2012) and animal models (Gupta 1974; Rezg et al. 2007; Lasram et al. 2015a); the most frequently found alteration is hyperglycemia (Abdollahi et al. 2004; Mostafalou et al. 2012; Lasram et al. 2015b). Hyperglycemia is a pathophysiologic state characterized by an abnormal increase in blood glucose concentrations; this state has a key role in the development of chronic diseases, such as diabetes mellitus type 2, stroke, and cardiovascular diseases (Levitan et al. 2004; Barclay et al. 2008; Stead et al. 2009).

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Ma. Elena Moreno-Godínez
emoreno20@hotmail.com

¹ Laboratorio De Toxicología y Salud Ambiental, Facultad De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria, 39070 Chilpancingo, Guerrero, Mexico

² Laboratorio De Investigación En Epidemiología Clínica y Molecular, Facultad De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, Chilpancingo, Mexico

³ Laboratorio de Inmunotoxicogenómica, Escuela Superior de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma De Guerrero, Chilpancingo, Mexico

⁴ Laboratorio De Investigación En Obesidad y Diabetes, Facultad De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, Chilpancingo, Mexico

Peripheral tissue and hepatic insulin resistance or enhanced hepatic glucose production have been associated with the induction of hyperglycemia states (Brealey and Singer 2009). Insulin resistance is associated with multiple risk factors, such as genetic factors, a sedentary lifestyle, a Western diet, and obesity (Petersen and Shulman 2006), while enhanced hepatic glucose production occurs in response to hepatic or tissue damage (Li and Messina 2009).

Exposure to malathion in animal models has proven to be a risk factor for the development of hyperglycemia by inducing insulin resistance (Mostafalou et al. 2012; Lasram et al. 2015a) and enhancing hepatic glucose production (Abdollahi et al. 2004; Pournourmohammadi et al. 2005; Vosough-Ghanbari et al. 2007), although results have been inconsistent (Rezg et al. 2006, 2007; Flehi-Slim et al. 2015). Thus, it is necessary to perform a systematic review and meta-analysis of the results obtained in animal models to provide an external validation of primary studies, which could reduce the risk of publication bias (Hooijmans et al. 2014a). In the present work, we performed a systematic review and meta-analysis to arrive at pooled estimates for the effect of malathion exposure on blood glucose concentrations in animal models.

Materials and methods

To carry out this work, we followed the recommendations of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (Liberati et al. 2009). A literature search was performed on databases (PUBMED, EBSCO, Google Scholar) (up to 12/2016) using the following term restrictions: “organophosphates pesticides,” “malathion,” “glucose,” “impaired glucose toleration,” “blood glucose,” “insulin resistance,” and “animal models.” The terms were grouped into three principal components “malathion,” “blood glucose concentration,” and “animal models.” We used the Medical Subject Headings (MeSH) terms; in addition, the most frequent synonyms were added. The full strategy for each individual component is presented in the Table 1. The search also included the review of the cited bibliographies to identify omitted articles.

Selection criteria and data extraction

The selection criteria were as follows: original articles that (1) administered malathion to rats, (2) provided the number of animals used for each experimental group, (3) and reported the administered dose and time of exposure. When duplicate works of a research group existed, only the most recent report was considered. The result of interest was the blood glucose concentration expressed as the mean and standard error (or the data for their estimation). Data were screened and extracted

independently by two investigators to identify and determine if a study was included in this meta-analysis. Differences in data extraction between investigators were infrequent and were resolved by consensus. The following data was extracted from each study: the publication year, name of the first author, number of animals for each experimental group, dose administered, time of exposure, and blood glucose concentration.

Methodological quality assessment

Two independent reviewers submitted the studies that fulfilled our inclusion criteria to quality assessment. We used the “SYRCLE’s risk of bias tool for animal studies” (Hooijmans et al. 2014b), as a standardized method for quantification of the risk of bias. The quality assessment for all the included studies was expressed as a percentage. The division of the number of articles that fulfilled with an item described in SYRCLE’s risk tool and the total number of papers included was used for estimated this percentage.

Statistical analysis

We performed a meta-regression with random effects to estimate the changes in blood glucose concentrations from exposure to malathion. The statistical model was $y_i = \mu + \beta x_i + \tau_i + \varepsilon_i$; this model allows for the estimation of the variability between studies, and proportioned estimations of the parameters were considered (Harbord and Higgins 2008). The mean and linear splines were used to assess the dose-response relationship; because this model does not have an “a priori” statistical function, the x-axis was divided into equal-width intervals and then the median of y and the median of x were estimated in each interval (Gould 1993). In addition, the mean differences and their 95% confidence intervals (95% CIs) of blood glucose concentration were estimated in each study using random effects; for this estimation, the I^2 test was performed to measure heterogeneity, as this parameter indicates the proportion of variation between studies with respect to total variation (Sterne et al. 2008). Statistical analyses were performed using the statistical package STATA version 13.0 (College Station, TX).

Results

We identified 35 relevant articles through searching databases, and eight studies fulfilled our inclusion criteria and were included in the meta-analysis (Fig. 1). All studies used rats (albino Wistar rats) as an experimental model. In addition, malathion was administered orally, intramuscularly or intraperitoneally, and the control groups received only the vehicle control without malathion. Each study reported the measurement of blood glucose concentrations after exposure to malathion.

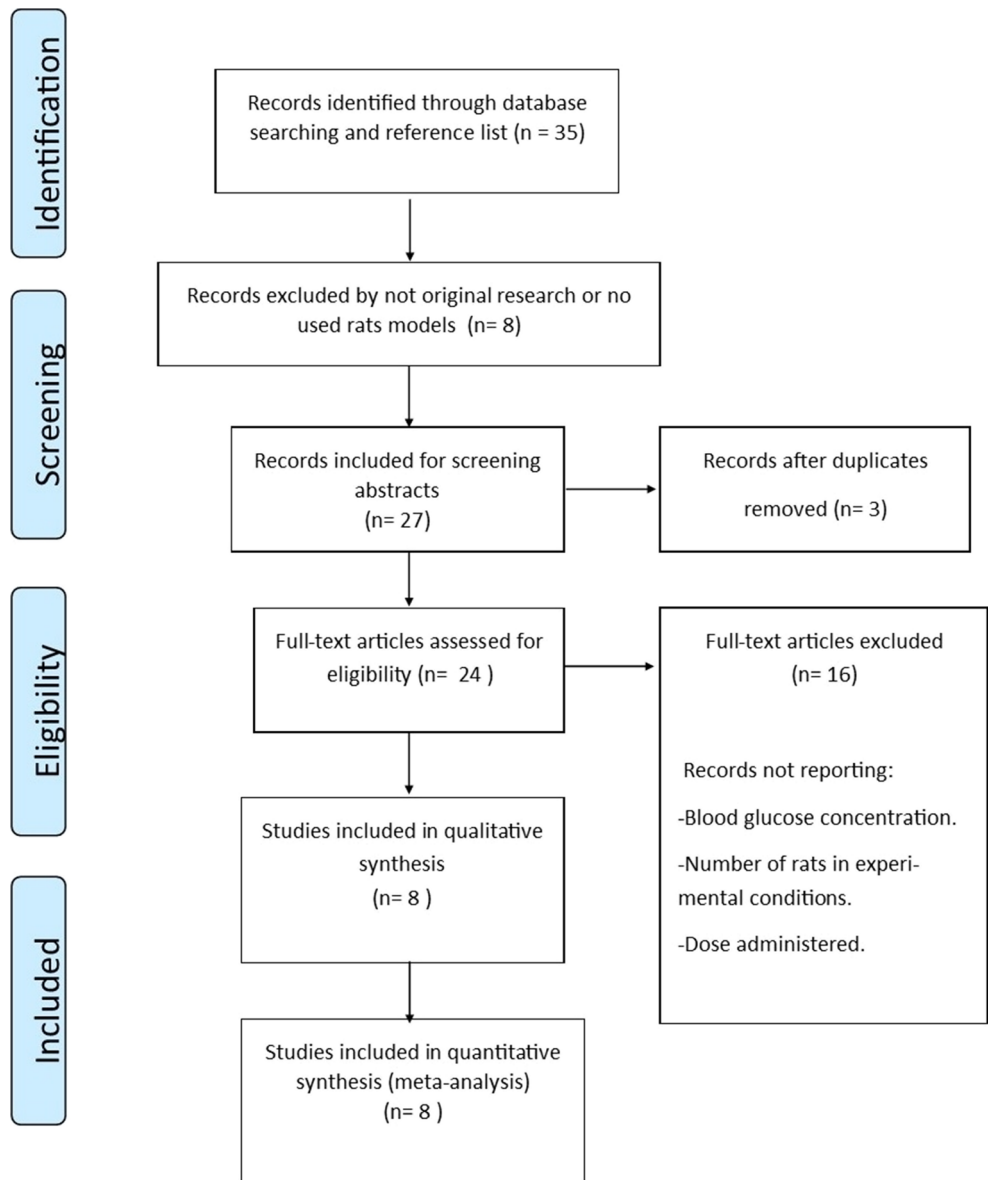
Table 1 Terms of restriction used for screening in the database

Component 1: “Malathion”	“malathion”[MeSH Terms] OR “malathion”[All Fields]
Component 2: “Blood glucose concentration”	((“glucose”[MeSH Terms] OR “glucose”[All Fields]) OR (“blood glucose”[MeSH Terms] OR (“blood”[All Fields] AND “glucose”[All Fields]) OR “blood glucose”[All Fields]) OR (“insulin resistance”[MeSH Terms] OR (“insulin”[All Fields] AND “resistance”[All Fields]) OR “insulin resistance”[All Fields]))
Component 3: “Animal models”	(“rats”[MeSH Terms] OR “rats”[All Fields] OR “rat”[All Fields]) AND “animals”[MeSH Terms:noexp]

The assessment of methodological quality of the studies included in this review showed that these have a low risk of bias (Fig. 2). These works meet most of the criteria for assessing the methodological quality according to the SYRCLE’s risk of bias tool for animal studies. However, the items “Was the allocation to the different groups adequately concealed

during?, Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each animal received during the experiment?, Were animals selected at random for outcome assessment?” showed a 100% of the unclear risk of bias.

Fig. 1 Flow diagram of the selection and eligibility of studies



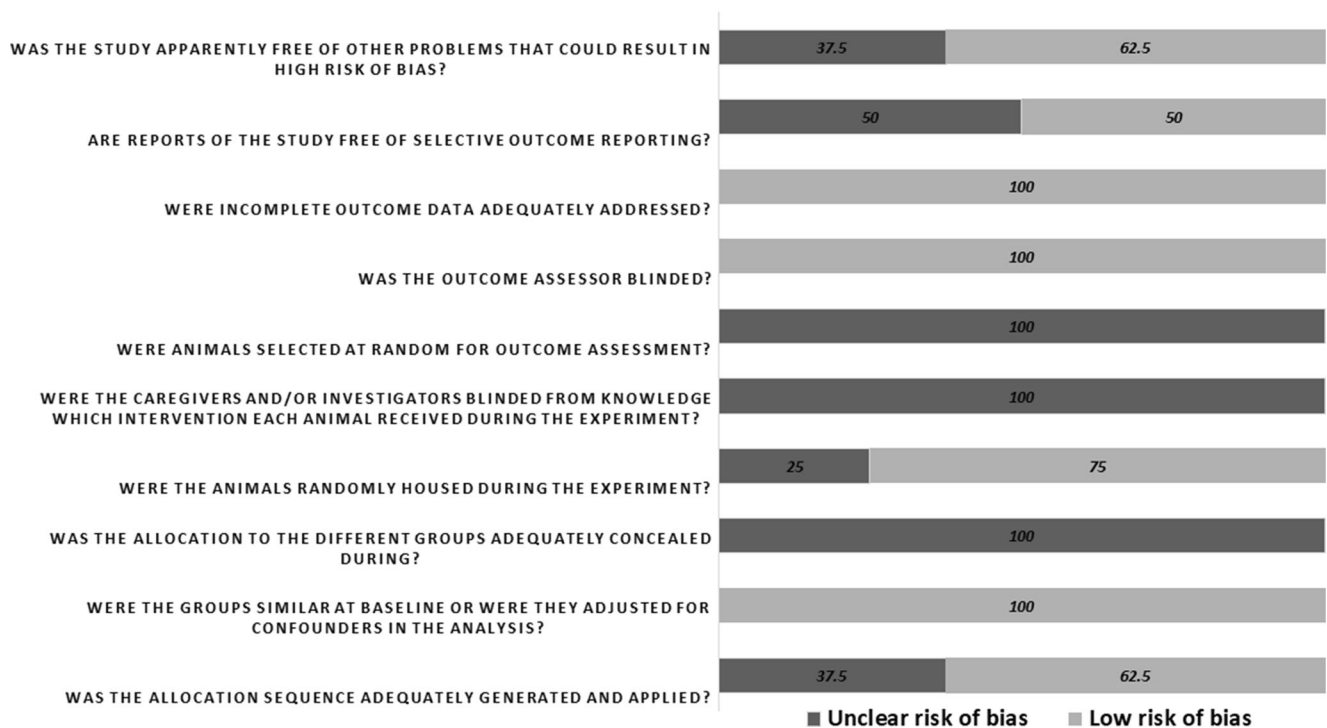


Fig. 2 Methodological quality of included studies using SYRCLE’s risk of bias tool. The risk of bias as a percentage for each item contemplate is shown

The time of exposure varied among the studies and was categorized as acute (<48 h) or chronic (>48 h) exposure; the dose administered was also diverse and was categorized and reported for rats as low dose (≤ 200 mg/kg) or high dose (> 200 mg/kg), considering a 1/10 of the lethal dose 50 (2000 mg/kg, reviewed in WHO, 2009), Table 2. Alteration in some metabolic parameters in animal models exposed to malathion is shown (Table 3).

As shown in Fig. 3, a non-monotonic dose-response curve comparing blood glucose concentrations and malathion dose was determined. At low doses, a semi-linear response was observed. However, at higher doses of exposure, the blood glucose concentrations decreased. The results of meta-regression showed a significant effect of exposure to malathion on blood glucose concentration ($\beta = 0.21$; 95% CI, 0.1–0.3, $p = 0.001$; $R^2_{adj} = 40.42\%$).

Stratified analyses of the time of exposure showed that chronic exposure of malathion increased the effect on blood glucose concentration ($\beta = 0.4$, 95% CI, 0.06–0.7, $p = 0.025$; $R^2_{adj} = 23.03\%$) compared to that of acute exposure ($\beta = 0.2$, 95% CI, 0.2–0.3, $p = 0.004$; $R^2_{adj} = 98.98\%$).

A pooled analysis using a random effects model showed that blood glucose concentrations were 3.3-fold higher in exposed rats than in the control group (95% CI, 2–5; $Z = 3.86$; $p < 0.0001$), and significant heterogeneity was observed ($p < 0.0001$, $I^2 = 89.6\%$) (Fig. 4).

Discussion

The present study focused on determining the abnormal increase of blood glucose concentrations after exposure to malathion in animal models. Hyperglycemia is an abnormal state of an increase in blood glucose concentrations. Long and frequent periods of hyperglycemia are associated with the development of chronic diseases (Levitan et al. 2004; Barclay et al. 2008; Stead et al. 2009), and the pathogenic mechanism is by the induction of insulin resistance (Tomás et al. 2002).

The effect of malathion on blood glucose concentration followed a non-monotonic dose-response curve. Exposure to doses less than 200 mg/kg showed a semi-linear dose-response effect. An increase in blood glucose concentration could be attributed to enhanced hepatic glucose production by the overstimulation of enzymes implicated in glycogenolysis (such as glucogen phosphorylase) or in neoglucogenesis (such as phosphofructokinase) in the liver (Abdollahi et al. 2004; Basiri et al. 2007) or muscle tissue (Pournourmohammadi et al. 2005) at low doses. However, exposure to high doses of malathion (> 200 mg/kg) could have decreased blood glucose concentrations by liver injury (Bissell et al. 2001). Along these lines, chickens exposed to 10 mg/kg malathion for 60 days showed liver necrosis (Sodhi et al. 2008). Additionally, hypoglycemia has been reported in chicken embryos exposed to malathion, and this reduction in blood glucose concentrations could be due to liver injury (Arsenault et al. 1975). A similar effect has been reported

Table 2 Characteristics of the studies contributing to the analysis of the effect of malathion exposure on blood glucose concentration

Study, year	Administered dose (mg/kg)	n ^a	Time of exposure (h)		Blood glucose concentration (mg/dL) ^b
			Acute (≤ 48 h)	Chronic (> 48 h)	
Basiri et al. (2007)	0	4		432	62.2 (3.11)
		4		672	63.4 (3.17)
	20	4		432	76.4 (3.8)
		4		672	72.2 (3.61)
Flehi-Slim et al. (2015)	0	6		720	162.14 (4.93)
	1.3	6		720	164.12 (1.91)
	13.7	6		720	176.91 (4.63)
	137	6		720	192.77 (7.94)
Lasram et al. (2015b)	0	12		672	107 (2)
	200	12		672	196 (5)
Matin and Siddiqui (1982)	0	6	0.5		95.1 (2.9)
	500	6	0.5		215 (10.9)
Matin and Husain (1987)	0	6	2		94.6 (4.06)
	500	6	2		200.5 (3.34)
Mostafalou et al. (2012)	0	6		768	89.16 (5.7)
	25	6		768	119.5 (2.61)
	50	6		768	112.3 (4.13)
Poumoumohammadi et al. (2005)	0	8		672	102.7 (5.5)
	10	8		672	148.3 (6.6)
	20	8		672	164.9 (7.7)
Rezg et al. (2007)	0	16		768	116 (24)
	100	16		768	120 (15)

^a Number of albino Wistar rats for each experimental group

^b Value displayed as the mean and standard error

in animals exposed to other OP such as diazinon (Teimouri et al. 2006; Ghafour-Rashidi et al. 2007), chlorpyrifos (Acker and Nogueira 2012), monocrotophos (Joshi and Rajini 2012), acephate (Joshi and Rajini 2009), and parathion (Lassiter et al. 2008). The overstimulation of glycogenolysis enzymes was linked with the increase of blood glucose concentration. In addition, hyperglycemic effects have been observed in several acute OP poisoning in humans (Rahimi and Abdollahi 2007), which suggests that the induction of hyperglycemia is a possible mechanism through which OP exert their toxicological effects.

Chronic exposure to malathion (> 48 h) was associated with greater changes in blood glucose concentrations compared with acute exposure (< 48 h). It has been reported that the effects of malathion on blood glucose concentration is time-dependent, with the major changes in glucose occurring shortly after exposure (< 6 h) (Gupta 1974) because an increase in blood glucose is transitory (Lasram et al. 2008). Chronic exposure to malathion increased the frequency of hyperglycemia states; this could be induced by the cell death of β-pancreatic cells (Biarnés et al. 2002). Reduction in the

number of β-pancreatic cells has been associated with an exacerbation of hyperglycemia states (Anuradha et al. 2014).

The blood glucose could be metabolized through of glycolytic pathways to the finished product “pyruvate” that is metabolized into mitochondria by the pyruvate dehydrogenase (PDH) to acetyl coenzyme A (acetyl-CoA). The acetyl-CoA is condensed with oxaloacetate and it can then be oxidized; this process generates citrate (García-Ruiz et al. 2013). Citrate is a negative regulator for glycolysis enzymes (Usenik and Legiša 2010). The reduction of glycolysis activity disrupt the metabolism of glucose lead to the persistence of hyperglycemic; malathion has shown the capacity for decrease glycolytic enzymes (Ismail 2013), this could be a reason for the hyperglycemia.

In addition, the exposure to OP has been linked with the increase in de novo lipid synthesis by the overstimulation of fatty acid synthetase (FAS) (Howell et al. 2016). The effects of malathion on the activity of FAS are unknown. However, an increase in blood levels of triglycerides and cholesterol has been reported in animals exposed (Ismail 2013; Lasram et al. 2015a). The increase of fatty acid levels leads to the

Table 3 Alteration in some metabolic parameters in animal models exposed to malathion

Source	Dosage	Number	Duration	Outcomes and results (compared with controls)	Comments
Abdollahi et al.(2004)	0, 100, 200, and 400 ppm	6	4 weeks	↑Glu; ↑GP; ↑PEPCK; ↔BW	Hyperglycemic state was associated with the overstimulation of glycolysis and gluconeogenesis enzymes.
Chowdhury et al. (1980)	1 g/kg of BW	NA	48 h	↓Glucose uptake	The reduction of glucose uptake was observed without cellular damage in the intestine.
Gupta (1974)	50 mg/100 g of BW	NA	6 and 12 h	↑Glu; ↑GIY	The transitory hyperglycemic state was observed.
Ismail (2013)	1.28 mg/kg of BW	8	4 weeks	↓HK; ↓PK; ↓PFK; ↓LDH; ↓GPI; ↑Chol; ↑Tg, ↑AST; ↑ALP ↑ALT; ↑γGT	The co-application of vitamin C, decrease the hyperglycemic effects of malathion.
Johri et al. (2013)	NA	6	42 days	↑Glu; ↑AST; ↑ALT	The hyperglycemic state was observed.
Lasram et al. (2008)	400 mg/kg of BW	10	2–12 h	↑Glu; ↑GIY; ↑MDA	Reduction in pancreatic cellularity and the induction of oxidative stress were associated with a hyperglycemic state.
Lasram et al. (2014b)	200 mg/ kg of BW	12	28 days	↑Glu; ↓GIY; ↑AST; ↑ALT; ↑Ins; ↑HbA1c; ↑HOMA-IR; ↑MDA, ↓GSH; ↓SOD; ↑IL-1β	Hyperglycemic state was associated with the induction of insulin resistance, oxidative stress, and inflammatory response.
Lasram et al. (2015a)	200 mg/kg of BW	8	28 days	↑Glu; ↓GIY; ↑Ins; ↑HbA1c ↑HOMA-IR; ↑Chol; ↑Tg, ↓HDL-C; ↑LDL-C	The induction of dyslipidemia and insulin resistance lead to hyperglycemia state.
Nili-Ahmadabadi et al. (2013)	400 mg/kg of BW	6	2 h	↑OGGT; ↓Ins; ↑ROS; ↑MDA; ↑CPG; ↑8-OHdG	Acute exposure decreases the insulin secretion; with induction of oxidative stress in pancreatic cells.
Panahi et al. (2006)	100-, 200-, and 400-ppm or 3-, 15-, and 75 mg/kg of BW	6	4 weeks or 0.5 h	↑Glu; ↑GK; ↑GDH	Alterations in enzymes implicated in the insulin release were observed.
Ramu and Korner (1975)	2 g/kg of BW	8	6 h	↑Glu	The application of atropine inhibit the hyperglycemic effects of malathion.
Rezg et al. (2006)	100 mg/kg of BW	12	32 days	↑GLY; ↑HK	Glycogen levels increase without changes in blood glucose concentrations.
Rodrigues et al. (1986)	650 mg/kg of BW	NA	0.5–4 h	↑Glu	The transitory hyperglycemic state was observed.
Ruckmani et al. (2011)	NA	6	0.3–4 h or 7–28 days	↑Glu; ↓GSH; ↓SOD; ↓CAT; ↓GPx; ↓GR; ↓GSH	The induction of oxidative stress in pancreatic cells was associated with a hyperglycemic stage.
Tuzcu et al. (2014)	10 mg/kg of BW	NA	24 h	↑Glu; ↑Ins, ↑TOS; ↓TAC	Hepatic inflammatory damage was associated with the development of hyperglycemic state.
Wali et al. (1984)	5 mg/100 g of BW	6	45 days	↓Glucose uptake	The capacity for adsorbing glucose in the intestine was observed.

NA non-available data, BW body weight, ↑ increase, ↓ decrease, ↔ no change, *Glu* glucose, *GP* glycogen phosphorylase, *PEPCK* phosphoenolpyruvate carboxykinase, *GIY* glycogen, *HK* hexokinase, *PK* piruvatekinase, *PFK* phosphofructokinase, *LDH* lactate dehydrogenase, *GPI* glucose phosphate isomerase, *Chol* cholesterol, *Tg* triglyceride, *AST* aspartate aminotransferase, *ALT* alanine aminotransferase, *γGT* gamma glutamyl transferase, *ALP* alkaline phosphatase, *MDA* malondialdehyde, *Ins* insulin, *HbA1c* glycated hemoglobin, *HOMA-IR* homeostasis model assessment to assess insulin resistance, *GSH* reduced glutathione, *SOD* superoxide dismutase, *IL-1β* interleukin 1β, *HDL-C* high density lipoprotein cholesterol, *LDL-C* low density lipoprotein cholesterol, *GLYC* glycerol, *Lact* lactate, *GlyK* glycerol kinase, *GS3Kb* glycogen synthase kinase 3b, *OGGT* oral glucose tolerance test, *ROS* reactive oxygen species, *CPG* carbonyl groups, *8-OHdG* 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, *GK* glucokinase, *GDH* glutamate dehydrogenase, *HK* hexokinase, *GPx* glutathione peroxidase, *GR* glutathione reductase, *TOS* total oxidants, *TAC* total antioxidant capacity

activation of protein kinase C (PKC). PKC is a serine kinases leading to increase in serine phosphorylation in insulin receptor substrates (IRS) and a decrease in the activity de PI3K-Akt pathway; this results in the

reduction of glucose uptake stimulated by insulin lead to hyperglycemia (Mittra et al. 2008).

On another hand, the hyperglycemia observed in animals exposed to malathion has been linked with the oxidative stress

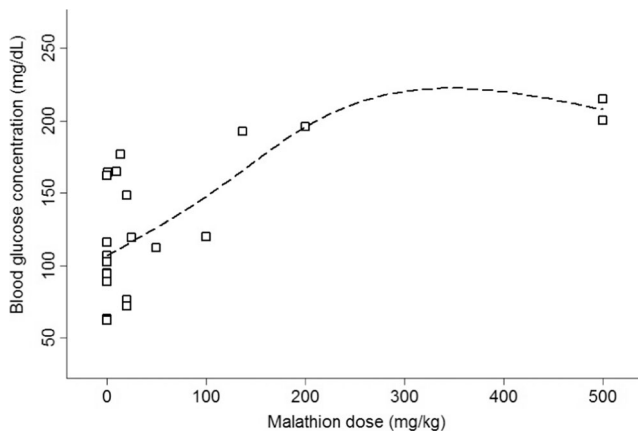


Fig. 3 Effect of malathion on the blood glucose concentration. Median spline plots from dose-response curves are presented. Squares indicate observed mean in individual studies. The dotted line is conformed of linear segments whose slopes represent the dose-response relationship in a specific range of values of the malathion dosage administered

induction (Lasram et al. 2008, 2014a, b; Ruckmani et al. 2011; Nili-Ahmadabadi et al. 2013; Tuzcu et al. 2014). This cellular condition is associated with the activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK). The JNK is a serine-kinase that increases the serine phosphorylation in IRS leads to their degradation with the negative regulation of PI3k-Akt pathway (Lee et al. 2003). This event reduces the GLUT4 translocation, resulting in a decrease in the glucose uptake and consumption that enhances the hyperglycemia (Tarantino and Caputi 2011).

The pooled analysis of the studies included in this work showed that exposure to malathion increased the blood glucose concentrations in exposed rats by 3.3-fold. The inter-individual variability in response to a toxin is a widely observed phenomenon; this variability has been attributed to genetic, phenotypic, and environmental factors and their interaction (Nebert 2005). In animal models, this variability has

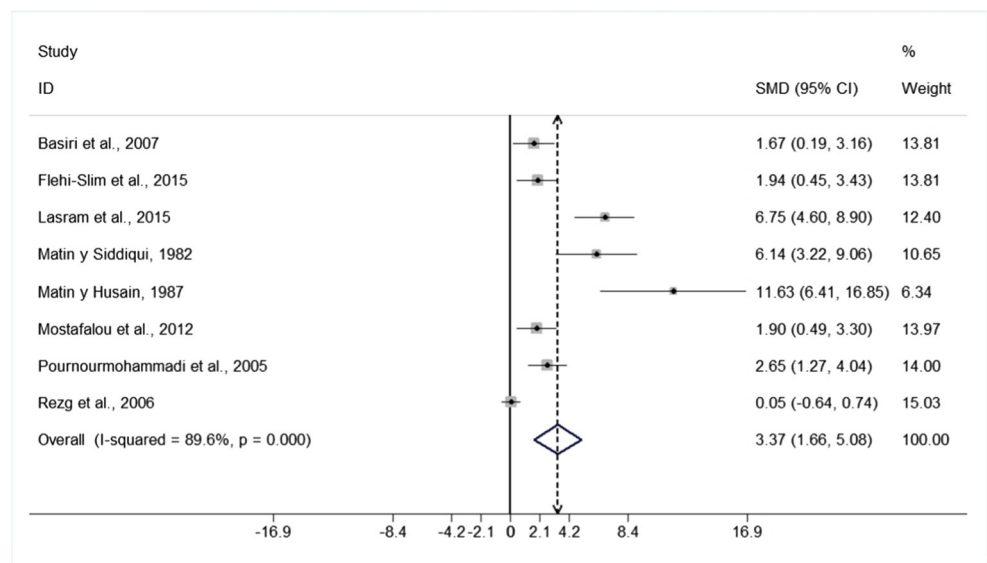
been observed. Figure 3 shows a high variability of basal (0 mg/kg) blood glucose concentrations, and inter-individual variability could be the cause of high and significant heterogeneity. In addition, meta-analyses of animal studies have often shown high heterogeneity attributed to differences in the species used and the design of the intervention protocols (Hooijmans et al. 2014a).

Data obtained in this work suggested that chronic or acute exposure to malathion increased the blood glucose concentration. However, only eight studies were included. The small number of articles used and the higher background inter-individual variability of the animals are some limitations. In addition, only two studies with a negative result were included; a possible overestimation of associations is feasible. However, this work agrees with a large body of evidence that shows a relation between OP exposure and hyperglycemia (Mostafalou 2016; Rahimi and Abdollahi 2007; Rezg et al. 2010; Mostafalou et al. 2012; Lasram et al. 2014a, b). The implementation of experimental models without high variability, such as in vitro models, is necessary to determine a possible mechanism of induced hyperglycemia after exposure to an OP.

Conclusions

In conclusion, the results obtained in this systematic review and meta-analysis of the primary studies based on animal models showed a positive/negative relationship between malathion exposure and the induction of a hyperglycemic state, validating the hyperglycemic effect of malathion. These results provide important information that consider the exposure to an OP as a possible risk factor for the development of insulin resistance.

Fig. 4 Forest plot of the blood glucose concentration after exposure to malathion generated from a random-effect model. The standardized mean difference (SMD) between the rats treated with malathion and control group with the 95% CIs is presented. The size of the gray box is proportional to the weight assigned to each study, and horizontal lines represent the 95% CIs



Acknowledgments The authors thank MBS. Teresa Domínguez Reyes for her technical assistance and data collection. This work was partially supported by Red Temática de Toxicología de Plaguicidas (CONACYT-253789/271775). RVMA was a recipient of a scholarship from CONACYT-Mexico (#276990).

References

- Abdollahi M, Donyavi M, Pournourmohammadi S, Saadat M (2004) Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 137(4):343–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.03.009>
- Acker CI, Nogueira CW (2012) Chlorpyrifos acute exposure induces hyperglycemia and hyperlipidemia in rats. *Chemosphere* 89(5):602–608. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.059>
- Anuradha R, Saraswati M, Kumar KG, Rani SH (2014) Apoptosis of beta cells in diabetes mellitus. *DNA Cell Biol* 33(11):743–748. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2352>
- Arsenault AL, Gibson MA, Mader ME (1975) Hypoglycemia in malathion-treated chick embryos. *Can J Zool* 53(8):1055–1057. <https://doi.org/10.1139/z75-122>
- Barclay AW, Petocz P, McMillan-Price J, Flood VM, Prvan T, Mitchell P, Brand-Miller JC (2008) Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk—a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 87(3):627–637
- Basiri S, Esmaily H, Vosough-Ghanbari S, Mohammadirad A, Yasa N, Abdollahi M (2007) Improvement by Satureja khuzestanica essential oil of malathion-induced red blood cells acetylcholinesterase inhibition and altered hepatic mitochondrial glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *Pestic Biochem Physiol* 89(2):124–129. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.04.006>
- Biamés M, Montolio M, Nacher V et al (2002) β -cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 51(1):66–72. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.1.66>
- Bissell DM, Gores GJ, Laskin DL, Hoofnagle JH (2001) Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems. *Hepatology* 33(4):1009–1013. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.23505>
- Brealey D, Singer M (2009) Hyperglycemia in critical illness: a review. *J Diabetes Sci Technol* 3(6):1250–1260. <https://doi.org/10.1177/193229680900300604>
- Chowdhury JS, Dudeja PK, Mehta SK, Mahmood A (1980) Effect of a single oral dose of malathion on D-glucose and glycine uptake and on brush border enzymes in rat intestine. *Toxicol Lett* 6(6):411–415. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(80\)90115-0](https://doi.org/10.1016/0378-4274(80)90115-0)
- Fakhri-Bafghi MS, Ghasemi-Niri SF, Mostafalou S et al (2016) Protective effect of selenium-based medicines on toxicity of three common organophosphorus compounds in human erythrocytes in vitro. *Cell J Yakhteh* 17:740–747
- Flehi-Slim I, Chargui I, Boughattas S, el Mabrouk A, Belaïd-Nouira Y, Neffati F, Najjar MF, Haouas Z, Cheikh HB (2015) Malathion-induced hepatotoxicity in male Wistar rats: biochemical and histopathological studies. *Environ Sci Pollut Res* 22(22):17828–17838. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5014-5>
- García-Ruiz C, Baulies A, Mari M, García-Rovés PM, Fernandez-Checa JC (2013) Mitochondrial dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: cause or consequence? *Free Radic Res* 47(11):854–868. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.830717>
- Ghafour-Rashidi Z, Dermenaki-Farahani E, Aliahmadi A, Esmaily H, Mohammadirad A, Ostad SN, Abdollahi M (2007) Protection by cAMP and cGMP phosphodiesterase inhibitors of diazinon-induced hyperglycemia and oxidative/nitrosative stress in rat Langerhans islets cells: molecular evidence for involvement of non-cholinergic mechanisms. *Pestic Biochem Physiol* 87(3):261–270. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.08.007>
- Gould WW (1993) Linear splines and piecewise linear functions. *Stata Tech Bull* 15:13–17
- Gupta PK (1974) Malathion induced biochemical changes in rats. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 35(3):191–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1974.tb00738.x>
- Harbord RM, Higgins JP (2008) Meta-regression in Stata. *Meta* 8:493–519
- Hooijmans CR, IntHout J, Ritskes-Hoitinga M, Rovers MM (2014a) Meta-analyses of animal studies: an introduction of a valuable instrument to further improve healthcare. *ILAR J* 55(3):418–426. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu042>
- Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB et al (2014b) SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol* 14(1):43. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>
- Howell GE, Mulligan C, Young D, Kondakala S (2016) Exposure to chlorpyrifos increases neutral lipid accumulation with accompanying increased de novo lipogenesis and decreased triglyceride secretion in McArdle-RH7777 hepatoma cells. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA* 32:181–189. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.002>
- Ismail SM (2013) Protective effects of vitamin C against biochemical toxicity induced by malathion pesticides in male albino rat. *J Evol Biol Res* 5:1–5
- Johri R, Dayal V, Johri PK (2013) In vivo effect of selected synthetic vegetable pesticides (malathion, chlorpyrifos and cypermethrin) with special reference to hematological and biochemical parameters of albino rat. *J Exp Zool India* 16:65–79
- Joshi AKR, Rajini PS (2009) Reversible hyperglycemia in rats following acute exposure to acephate, an organophosphorus insecticide: role of gluconeogenesis. *Toxicology* 257(1-2):40–45. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.12.006>
- Joshi AKR, Rajini PS (2012) Hyperglycemic and stressogenic effects of monocrotophos in rats: evidence for the involvement of acetylcholinesterase inhibition. *Exp Toxicol Pathol* 64(1-2):115–120. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.07.003>
- Karami-Mohajeri S, Abdollahi M (2011) Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Hum Exp Toxicol* 30(9):1119–1140. <https://doi.org/10.1177/0960327110388959>
- Karami-Mohajeri S, Hadian MR, Fouladdel S, Azizi E, Ghahramani MH, Hosseini R, Abdollahi M (2014) Mechanisms of muscular electrophysiological and mitochondrial dysfunction following exposure to malathion, an organophosphorus pesticide. *Hum Exp Toxicol* 33(3):251–263. <https://doi.org/10.1177/0960327113493300>
- Lasram MM, Annabi AB, Rezg R, Elj N, Slimen S, Kamoun A, El-Fazaa S, Gharbi N (2008) Effect of short-time malathion administration on glucose homeostasis in Wistar rat. *Pestic Biochem Physiol* 92(3):114–119. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.06.006>
- Lasram MM, Dhoub IB, Annabi A, El Fazaa S, Gharbi N (2014a) A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. *Toxicology* 322:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.04.009>
- Lasram MM, Dhoub IB, Bouzid K, Lamine AJ, Annabi A, Belhadjmida N, Ahmed MB, Fazaa SE, Abdelmoula J, Gharbi N (2014b) Association of inflammatory response and oxidative injury in the pathogenesis of liver steatosis and insulin resistance following subchronic exposure to malathion in rats. *Environ Toxicol*

- Pharmacol 38(2):542–553. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.08.007>
- Lasram MM, Bouzid K, Douib IB, Annabi A, El Elj N, El Fazaa S, Abdelmoula J, Gharbi N (2015a) Lipid metabolism disturbances contribute to insulin resistance and decrease insulin sensitivity by malathion exposure in Wistar rat. *Drug Chem Toxicol* 38(2):227–234. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.933348>
- Lasram MM, El-Golli N, Lamine AJ, Douib IB, Bouzid K, Annabi A, El Fazaa S, Abdelmoula J, Gharbi N (2015b) Changes in glucose metabolism and reversion of genes expression in the liver of insulin-resistant rats exposed to malathion. The protective effects of N-acetylcysteine. *Gen Comp Endocrinol* 215:88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.002>
- Lassiter TL, Ryde IT, MacKillop EA, Brown KK, Levin ED, Seidler FJ, Slotkin TA (2008) Exposure of neonatal rats to parathion elicits sex-selective reprogramming of metabolism and alters the response to a high-fat diet in adulthood. *Environ Health Perspect* 116(11):1456–1462. <https://doi.org/10.1289/ehp.11673>
- Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF (2003) c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 278(5):2896–2902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208359200>
- Levitan EB, Song Y, Ford ES, Liu S (2004) Is nondiabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease?: a meta-analysis of prospective studies. *Arch Intern Med* 164(19):2147–2155. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.19.2147>
- Li L, Messina JL (2009) Acute insulin resistance following injury. *Trends Endocrinol Metab* TEM 20(9):429–435. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.06.004>
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al (2009) The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *Ann Intern Med* 151:W–65
- Matin MA, Husain K (1987) Cerebral glycogenolysis and glycolysis in malathion-treated hyperglycaemic animals. *Biochem Pharmacol* 36(11):1815–1817. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90243-7)
- Matin MA, Siddiqui RA (1982) Effect of diacetylmonoxime and atropine on malathion-induced changes in blood glucose level and glycogen content of certain brain structures of rats. *Biochem Pharmacol* 31(9):1801–1803. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90692-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90692-X)
- Mitra S, Bansal VS, Bhatnagar PK (2008) From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome. *Drug Discov Today* 13(5-6):211–218. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.01.006>
- Mostafalou S (2016) Persistent organic pollutants and concern over the link with insulin resistance related metabolic diseases. *Rev Environ Contam Toxicol* 238:69–89. https://doi.org/10.1007/398_2015_5001
- Mostafalou S, Abdollahi M (2016) Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol* 91(2):1–51. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Mostafalou S, Eghbal MA, Nili-Ahmadabadi A, Baeeri M, Abdollahi M (2012) Biochemical evidence on the potential role of organophosphates in hepatic glucose metabolism toward insulin resistance through inflammatory signaling and free radical pathways. *Toxicol Ind Health* 28(9):840–851. <https://doi.org/10.1177/0748233711425073>
- Namba T (1971) Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. *Bull World Health Organ* 44(1-3):289–307
- Nebert DW (2005) Inter-individual susceptibility to environmental toxicants—a current assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 207(2):34–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.043>
- Nili-Ahmadabadi A, Pourkhalili N, Fouladdel S, Pakzad M, Mostafalou S, Hassani S, Baeeri M, Azizi E, Ostad SN, Hosseini R, Sharifzadeh M, Abdollahi M (2013) On the biochemical and molecular mechanisms by which malathion induces dysfunction in pancreatic islets in vivo and in vitro. *Pestic Biochem Physiol* 106(1-2):51–60. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.04.003>
- Panahi P, Vosough-Ghanbari S, Pournourmohammadi S, Ostad SN, Nikfar S, Minaie B, Abdollahi M (2006) Stimulatory effects of malathion on the key enzymes activities of insulin secretion in Langerhans islets, glutamate dehydrogenase and glucokinase. *Toxicol Mech Methods* 16(4):161–167. <https://doi.org/10.1080/15376520500191623>
- Petersen KF, Shulman GI (2006) Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 119(5):S10–S16. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.01.009>
- Pournourmohammadi S, Farzami B, Ostad SN, Azizi E, Abdollahi M (2005) Effects of malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism. *Environ Toxicol Pharmacol* 19(1):191–196. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.07.002>
- Raafat N, Abass MA, Salem HM (2012) Malathion exposure and insulin resistance among a group of farmers in Al-Sharkia governorate. *Clin Biochem* 45(18):1591–1595. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.07.108>
- Rahimi R, Abdollahi M (2007) A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. *Pestic Biochem Physiol* 88(2):115–121. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.10.003>
- Ramu A, Korner M (1975) Evidence of central influences on blood glucose level: malathion hyperglycemia. *Eur J Pharmacol* 32(1):120–123. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(75\)90331-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(75)90331-3)
- Rezg R, Mornagui B, El-Arbi M, Kamoun A, El-Fazaa S, Gharbi N (2006) Effect of subchronic exposure to malathion on glycogen phosphorylase and hexokinase activities in rat liver using native PAGE. *Toxicology* 223(1-2):9–14. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.02.020>
- Rezg R, Mornagui B, Kamoun A, El-Fazaa S, Gharbi N (2007) Effect of subchronic exposure to malathion on metabolic parameters in the rat. *C R Biol* 330(2):143–147. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.11.002>
- Rezg R, Mornagui B, El-Fazaa S, Gharbi N (2010) Organophosphorus pesticides as food chain contaminants and type 2 diabetes: a review. *Trends Food Sci Technol* 21(7):345–357. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.006>
- Rodrigues MA, Puga FR, Chenker E, Mazanti MT (1986) Short-term effect of malathion on rats' blood glucose and on glucose utilization by mammalian cells in vitro. *Ecotoxicol Environ Saf* 12(2):110–113. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(86\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(86)90046-1)
- Romero-Navarro G, Lopez-Aceves T, Rojas-Ochoa A, Mejia CF (2006) Effect of dichlorvos on hepatic and pancreatic glucokinase activity and gene expression, and on insulin mRNA levels. *Life Sci* 78(9):1015–1020. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.06.010>
- Ruckmani A, Nayar PG, Konda VGR, Madhusudha N, Madhavi E, Chokkaling M, Meti V, Sundaraval S (2011) Effects of inhalational exposure of malathion on blood glucose and antioxidants level in Wistar albino rats. *Res J Environ Toxicol* 5(5):309–315. <https://doi.org/10.3923/rjet.2011.309.315>
- Sodhi S, Sharma A, Brar APS, Brar RS (2008) Effect of α tocopherol and selenium on antioxidant status, lipid peroxidation and hepatopathy induced by malathion in chicks. *Pestic Biochem Physiol* 90(2):82–86. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.08.002>
- Stead LG, Gilmore RM, Belloio MF, Mishra S, Bhagra A, Vaidyanathan L, Decker WW, Brown RD Jr (2009) Hyperglycemia as an independent predictor of worse outcome in non-diabetic patients presenting with acute ischemic stroke. *Neurocrit Care* 10(2):181–186. <https://doi.org/10.1007/s12028-008-9080-0>
- Sterne JA, Bradburn MJ, Egger M (2008) Meta-analysis in Stata™. *Syst Rev Health Care Meta-Anal Context* Second Ed 347–369
- Tarantino G, Caputi A (2011) JNKs, insulin resistance and inflammation: a possible link between NAFLD and coronary artery disease. *World*

- J Gastroenterol 17(33):3785–3794. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i33.3785>
- Teimouri F, Amirkabirian N, Esmaily H, Mohammadirad A, Aliahmadi A, Abdollahi M (2006) Alteration of hepatic cells glucose metabolism as a non-cholinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* 25(12):697–703. <https://doi.org/10.1177/0960327106075064>
- Tomás E, Lin Y-S, Dagher Z et al (2002) Hyperglycemia and insulin resistance: possible mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 967(1):43–51. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04262.x>
- Tuzcu K, Alp H, Ozgur T, Karcioglu M, Davarci I, Evliyaoglu O, Karakus A, Hakimoglu S (2014) Oral intralipid emulsion use: a novel therapeutic approach to pancreatic β -cell injury caused by malathion toxicity in rats. *Drug Chem Toxicol* 37(3):261–267. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.838780>
- Usenik A, Legiša M (2010) Evolution of allosteric citrate binding sites on 6-phosphofructo-1-kinase. *PLoS One* 5(11):e15447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015447>
- Vosough-Ghanbari S, Sayyar P, Pournourmohammadi S, Aliahmadi A, Ostad SN, Abdollahi M (2007) Stimulation of insulin and glucagon synthesis in rat Langerhans islets by malathion in vitro: evidence for mitochondrial interaction and involvement of subcellular non-cholinergic mechanisms. *Pestic Biochem Physiol* 89(2):130–136. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.05.001>
- Wali RK, Singh R, Dudeja PK, Sarkar AK, Mahmood A (1984) Subchronic malathion treatment effects on rat intestinal functions. *Bull Environ Contam Toxicol* 33(1):289–294. <https://doi.org/10.1007/BF01625545>
- World Health Organization (WHO) (2010) The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. World Health Organization, Geneva

Anexo 3

Efecto protector de N-acetil-cisteína sobre la inducción de citotoxicidad, estrés oxidativo y genotoxicidad en células HepG2 expuestas a metamidofos

Efecto protector de N-acetil-cisteína sobre la inducción de citotoxicidad, estrés oxidativo y genotoxicidad en células HepG2 expuestas a metamidofos.

Marco Antonio Ramírez-Vargas ¹, Eugenia Flores-Alfaro ², Ma. Elena Moreno-Godínez ^{1,*}

1. Laboratorio de Toxicología y Salud ambiental. Facultad De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México.
2. Laboratorio de Investigación en Epidemiología clínica y molecular. Facultad De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México.

Autor de correspondencia:

Dra. Ma. Elena Moreno-Godínez. Laboratorio de Toxicología y Salud ambiental. Unidad Académica De Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma De Guerrero, México. Av. Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria Chilpancingo, Guerrero, México 39070.

Telephone: (52) (747) 4725503

Fax: (52) (747) 4725503

E-mail: emoreno20@hotmail.com

Abstract

Methamidophos (MET) is an organophosphate pesticide (OP) widely use in the word. This pesticide has been associated with the induction of cytotoxicity, oxidative stress, and DNA damage. However, these results were reported in researches that only tested low dosages in metabolic non-competent cells in acute time of exposure. This study evaluated the impact of chronic (48 and 96 h) exposure to non-cholinergic (10, 20, 50-mg/L) and cholinergic (350 and 500 mg/L) dosages on hepatocellular carcinoma cell line HepG2. Further, we analyzed possible attenuation of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity potentials of MET using N-acetylcysteine (NAC). The cytotoxicity was evaluated with MTT and Neutral red uptake assays, the changes in levels of intracellular reactive oxygen species (ROS), malonaldehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), were evaluated as oxidative stress biomarkers. The genotoxic effects were measured by alkaline comet assay. The results obtained showed that MET decreased the cell viability in HepG2. In addition, the oxidative stress biomarkers and DNA damage were increased in cells exposed to MET in comparison with vehicle control. The NAC co-administration decreased the cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity potentials of MET on HepG2 cells. This results supports the induction of oxidative stress as an important mechanism through which MET exert their toxicological effects.

Keywords: DNA damage, cytotoxicity, oxidative stress, N-acetylcysteine.

Introducción.

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias creadas con el fin de prevenir, destruir, repeler o controlar plagas (**Organization 2010**), de los plaguicidas más utilizados destacan los plaguicidas organofosforados (OP), los cuales son una de las clases más importantes por ser utilizados extensivamente para el control de plagas en cultivos agrícolas y para el control de vectores en todo el mundo (**Ecobichon 2001; Schreinemachers and Tipraqsa 2012**). Su uso excesivo y la exposición inevitable a estos xenobióticos han provocado daño en el ambiente y en la salud de la población (**Mostafalou and Abdollahi 2016**).

La fosforilación irreversible del sitio catalítico de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que actúa a nivel de la unión colinérgica y sináptica en el sistema nervioso autónomo y central, es el principal mecanismo de toxicidad asociado a la exposición a OP (**Kamanyire and Karalliedde 2004**). Sin embargo la inducción de estrés oxidativo se ha propuesto como un mecanismo de toxicidad asociado a la exposición a OP (**Lukaszewicz-Hussain 2010**). Los mecanismos probablemente implicados en la inducción de estrés oxidativo por la exposición a OP son: la alteración de los ciclos redox por el incremento de radicales libres (**Mishra and Srivastava 2013**), por el decremento de la capacidad antioxidantes celular (**Banerjee et al. 2001**) y por la sobre producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) asociadas a su metabolismo.

El metamidofos (MET), es un OP ampliamente utilizado en México (Sánchez-Guerra et al. 2011b), cuyo principal mecanismo de toxicidad es por la inhibición de la AChE (**Emerick et al. 2012**), también se ha establecido la inducción de estrés oxidativo y la subsecuente inducción de citotoxicidad como mecanismos a través de los cuales el MET ejerce su toxicidad (**Lu et al. 2012; Ramirez-Vargas et al. 2017**). Sin embargo los resultados obtenidos hasta el momento difieren en función de la dosis y tiempo de exposición y al modelo celular empleado.

Es conocido que los OP requieren de una bioactivación durante su metabolismo, este proceso es realizado por los CYP450 en el hígado (**Jokanović 2001**). Por esta razón los hepatocitos son más susceptible a la inducción de estrés oxidativo,

derivado de la metabolización de diferentes xenobióticos tales como los OP (**Limón-Pacheco and Gonsebatt 2009**).

La utilización de antioxidantes han mostrado un efecto protector frente a la inducción del daño oxidativo por organofosforados en humanos con envenenamiento agudo (**Vidyasagar et al. 2004**); en modelos animales (**Jallouli et al. 2016**) y en modelos in vitro (**Ehrich et al. 2011**).

Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto citotóxico y estrés oxidativo del MET en células HepG₂ como un sistema de ensayo basado en el hecho de que el hígado constituye el órgano principal de biotransformación de los OP, además investigamos los efectos de la suplementación NAC .

Material y métodos.

Tratamiento

El plaguicida utilizado fue Metamidofos grado técnico (pureza >97.7%, #CAS: 10265-92-6 de la casa comercial Sigma-Aldrich; Seeze, GER), el cual se disolvió en DMSO pureza >97.9% y se consideró que el volumen final del solvente en los cultivos celulares fuera menor al 1%. Las dosis que se utilizaron en el estudio fueron de 10-, 20-, 50-, 350- y 500-mg/L, las cuales fueron seleccionadas en función de ensayos de citotoxicidad (Figura 1 y 2).

Cultivo Celular

La línea celular HepG₂ (ATCC # HB-8065) fue donada por la Dra. Fragoso de la Universidad Autónoma De Morelos. Las células se cultivaron en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY), suplementado con suero fetal bovino (10%) y antibiótico/antimicótico (1%, 10 unidades de penicilina, estreptomina 0.001 mg y 0.025 µg de anfoterisina B). La incubación se realizó a 37 °C, en un ambiente humidificado con CO₂ al 5%. El tratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM) se realizó dos horas antes de la exposición a MET, este se indica con las siglas NAC.

Citotoxicidad

El efecto citotóxico del MET se determinó usando los ensayos colorimétricos cuantitativos de retención de rojo neutro y MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), utilizando las condiciones propuestas por (Repetto et al. 2008) y (Mosmann 1983) respectivamente. En ambos ensayos se utilizaron 100 000 cel/mL en placas de 96 pocillos con un volumen final de 200µL. Las células fueron expuestas a 10-, 20-, 50-, 350- o 500-mg/L a tiempos de 48 o 96 h. Posteriormente el medio fue retirado y se adiciono 100 µL de rojo neutro (40 µg/mL) o 100 µL de MTT (0.5 mg/mL) y se incubaron por 3 h. Para el ensayo de rojo neutro el colorante se retiró realizando 3 lavados con PBS (phosphate buffered saline, pH 7,4, NaCl 0.138M, KCl 0.0027M) y se adicionó 100 µL de solución solubilizadora (50% etanol/1% de glacial ácido acético), para el ensayo de MTT el medio se retira y los cristales de formazan se disuelven en 100 µL de DMSO, en ambos casos las placas se mantuvieron en movimiento constante durante 10 min, y la absorbancia se determinó a 545 nm con una longitud de onda referente de 600 nm. En cada prueba se utilizaron controles de vehículo (células tratadas con <1% de DMSO) y controles basales (células sólo con medio de cultivo). La viabilidad celular se expresó en porcentaje calculada en función del control de vehículo "DMSO". Se consideraron como concentraciones citotóxicas aquellas que fueron capaces de reducir en más del 10% la viabilidad celular (LC=10%). Cada concentración ensayada se realizó por sextuplicado en tres experimentos independientes. Las concentraciones utilizadas para ensayos posteriores serán no citotóxicas y de relevancia biológica.

Determinación de ROS

La generación intracelular de especies reactivas del oxígeno se determinó utilizando la sonda fluorogénica CellROX® Green (Life Technologies, Eugene, OR) siguiendo la especificaciones del fabricante, para ello 3×10^5 células por mL (en placas de 24 pozos en un volumen final 500 µL) se expusieron a 10-, 20-, 50-, 350- o 500-mg/L, en tiempos de 6 h, una vez terminado el tiempo de exposición las células se incubaron con 5 µM de CellROX por 30 min, el exceso de sonda fue eliminada al realizar tres lavados con PBS, entonces las células se re-suspendieron en 3 mL de PBS y la fluorescencia se determinó a 485/520 nm utilizando el citómetro de flujo

FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA). Determinando 100 000 eventos por condición ensayada, el análisis se realizó utilizando el software FACSDIVA V 6.1.3 (Becton Dickinson). Cada experimento se realizó por triplicado, en dos momentos independientes, en cada ensayo se utilizaron controles basales (células en medio de cultivo) y controles de vehículo (células con <1 % de DMSO).

Lipoperoxidación

El daño lipoperoxidativo se evaluó mediante la cuantificación de malonaldehído (MDA) utilizando el kit “LOP-FR 12” (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI), este ensayo se basa en la reacción del reactivo cromogénico N-metil-2-fenilindol con el MDA a 45°C el resultando en un compuesto cromogénico, para ello 1.5×10^6 cél/mL se expusieron a 10-, 20-, 50-, 350- o 500-mg/L, en tiempos de 48 o 96 h, posteriormente el medio se remueve y se realizan lavados con PBS, las células se recuperaron y homogenizaron en 20 µL de Tris-HCl a 50 mM a pH 7.4 y fueron sometidas a 5 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido/baño maría a 45 °C, seguido de la adición de 15 µL de N-metil-2-fenilindol y 15 µL de ácido clorhídrico 12 N. Esta mezcla se incubó por 1 h a 45°C seguido de la centrifugación a 14 000 r.p.m. por 15 min, el sobrenadante fue recuperado y la absorbancia se determinó a 586 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Atlanta, GO). Las concentraciones de MDA generado se calcularon en base a una curva estándar. Cada condición se realizó por duplicado en dos experimentos independientes. En cada ensayo se utilizaran controles basales (células en medio de cultivo) y controles de vehículo (células con <1 % de DMSO).

Determinación de glutatión reducido (GSH)

Se determinó las concentraciones de GSH utilizando el kit “Glutathion Assay” (Calbiochem, San Diego, CA). Este ensayo se basa en una reacción química que se realiza en dos fases. La primera fase conduce a la formación de productos de sustitución (tioéteres) y la segunda fase es una reacción de eliminación que se lleva a cabo en condiciones alcalinas, que específicamente transforma el producto de sustitución obtenido con GSH en un cromóforo con una absorbancia máxima a 400

nm. Para este experimento 1.5×10^6 células se expusieron a 10-, 20-, 50-, 350- o 500-mg/L, en tiempos de 48 o 96 h, terminado el tiempo de exposición el medio fue removido y se realizaron 3 lavados con PBS, entonces las células se re-suspendieron en 30 μ L de ácido metafosfórico (al 5% P/V en agua destilada) e inmediatamente se agitaron a 4°C, las células lisadas se centrifugaron a 3000 g a 4°C por 10 minutos. Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a 4°C durante 1 h. Seguido de la adición de 60 μ L de reactivo 1 y se mezcló, a esta mezcla se adicióno 5 μ L de NaOH al 30%. Esta mezcla se incubó por 10 min a 25°C en oscuridad, la absorbancia fue determinada a 400 nm, las concentraciones fueron calculadas en base a una curva estándar. Cada condición se realizó por triplicado en dos momentos independientes. En cada ensayo se utilizó controles basales (células en medio de cultivo) y controles de vehículo (células con <1 % de DMSO).

Genotoxicidad

El daño genotóxico del MET sobre las células HepG2 se evaluó mediante el ensayo cometa en condiciones alcalinas, de acuerdo al método modificado de (Singh et al. 1988). De manera breve, las células HepG2 se sembraron a una densidad celular de 2×10^5 células/mL en placas de 24 pozos. Se trataron con MET durante 48 y 96 h. Posterior al periodo de exposición las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en 75 μ L de medio basal DMEM y posteriormente fueron embebidas en 150 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (Sigma-Aldrich, EUA), de esta mezcla se colocaron 75 μ L en un portaobjetos previamente cubierto con 150 μ L agarosa 0.5% de punto de fusión normal (Sigma-Aldrich, EUA). Los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100mM, Tris 10 mM, DMSO 10% y Triton X100 1%) durante toda la noche a 4°C. El desenrollamiento del ADN se llevó a cabo en una solución alcalina (NaOH 300mM, 1mM Na₂EDTA) por 20 min, antes de la electroforesis horizontal a 4°C, 25 V (0.73 V/cm) y 300 mA durante 20 min. Los portaobjetos se lavaron con Tris-HCl 0.4M pH 4 y fueron deshidratados con etanol al 96%. Las laminillas se tiñeron con bromuro de etidio (20 μ M/mL) y se observaron en un microscopio de fluorescencia equipado con un excitador de 515-560 nm (Olympus BX-43), equipado con el software Comet Assay

IV, versión 4.3.1, (Perspective Instruments, Suffolk, UK). Los parámetros que se reportaron fueron los siguientes: Tail Momen (TM), Tail DNA intensity (Tail DNA %).

Resultados.

Efecto del metamidofos sobre la viabilidad celular.

La viabilidad celular pos-exposición a MET fue evaluada utilizando el ensayo de retención de rojo neutro (RN) y de MTT. El porcentaje de viabilidad celular estimado por RN demostró que el MET no induce efectos citotóxicos (reducción en más del 10% de la viabilidad celular) en las células HepG2 en ningún tiempo de exposición (Fig. 1), sin embargo estos resultados no fueron concordantes con los estimados por el ensayo de MTT, como se muestra en la figura 2, existe una reducción significativa de la viabilidad celular a dosis de 350 y 500 mg/L, cuando las células fueron expuestas por 48 h y 96 h.

Efectos del metamidofos sobre la inducción de ROS

La exposición por 6 h a MET incrementó los niveles intracelulares de ROS (figura 3). El incremento de los niveles de ROS fueron solamente significativos para las dosis de 350 y 500 mg/L (Figura 3).

Efecto del metamidofos sobre la lipoperoxidación

La exposición a MET por 48 y 96 h indujo el daño oxidativo de lípidos membranales. A 48 h el incremento del daño lipoperoxidativo respecto al control fue de 12.7-veces y 25.3-veces para las dosis de 350 y 500 mg/L respectivamente. Mientras que a 96 h de exposición el incremento en el daño lipoperoxidativo respecto al control de vehículo para las concentraciones de 350 y 500 mg/L fue de 17.5-veces y 35.8-veces respectivamente. (Fig. 4).

Efecto del metamidofos sobre los niveles de GSH.

La exposición por 46 y 96 horas a MET, reduce las concentraciones de GSH en las células HepG2. Como se observa en la figura 5, la exposición por 48 y 96 h a MET

se inducen la disminución de GSH a dosis de 350 o 500 mg/L la reducción es del 40% y 32% para las dosis de 350 y 500 mg/L a 48 h. Mientras que a una exposición de 96 h la reducción es de 30.7% y de 52.1% para las dosis de 350 y 500 mg/L respectivamente (Figura 5).

Efecto del MET sobre la inducción de daño al DNA

La exposición a MET induce el daño al DNA en células HepG2. Como se muestra en la figura 6, la exposición por 48 horas a dosis de 350 y 500 mg/L incrementaron el daño al DNA por 1.4-veces y 1.7-veces respectivamente, cuando el daño fue estimado a través del Tail Intensity; y en 1.9-veces y 2.4-veces cuando el daño fue estimado usando el Tail momento. El mayor daño al DNA fue observado en la exposición a 96 h, en el cual todas las dosis probadas incrementaron el daño al DNA (figura 7).

Efecto protector de la N-acetil-cisteína.

En el presente estudio se utilizó un antioxidante para evaluar la participación específica de ROS en la inducción de citotoxicidad, **lipoperoxidación** y *genotoxicidad en células HepG2 expuestas a MET. El pretratamiento con NAC mostro la inhibición de la inducción de ROS, disminuyó la lipoperoxidación y la genotoxicidad, como resultado inhibe el potencial citotóxico del MET.*

Discusión

El incremento en las ROS, la disminución en los sistemas antioxidantes y el subsecuente daño oxidativo y nitrosactivo a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos son considerados como estrés oxidativo (**Roberts et al. 2009**), este estado celular alterado puede ser inducido en respuesta a la exposición a diferentes xenobióticos como son los OP (Lukaszewicz-Hussain, 2010). Además el estrés oxidativo es considerado como factor de riesgo para el desarrollo de diversos estados patológicos ((**Yasukawa et al. 2005; Aroor and DeMarco 2014; Costa et al. 2015; de Andrade et al. 2015**)). En el presente estudio se ha investigado si la exposición a MET es capaz de inducir citotoxicidad, estrés oxidativo y genotoxicidad en células

HepG2 y el efecto protector de la N-acetil-Cisteína, los resultados sugieren que el MET es capaz de inducir citotoxicidad, estrés oxidativo y genotoxicidad en el modelo de estudio. Además se demostró que estos efectos tóxicos pueden ser prevenidos al utilizar un antioxidante. Lo cual establece la inducción de estrés oxidativo como un mecanismo de toxicidad asociado a la exposición a MET.

Los resultados obtenidos de la viabilidad celular muestran que el MET indujo citotoxicidad (la reducción del más del 10% en viabilidad celular) en células HepG2, sin embargo este efecto es solo observado a tiempos de exposición de 96 h y solo a dosis de 350 o 500 mg/L. El efecto citotóxico por exposición a MET se ha demostrado en diferentes modelos celulares en donde se ha observado que el MET induce muerte celular a dosis de 40 mg/L en PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) (**Ramirez-Vargas et al., 2017**), a 80 mg/L en PC12 (**Lu et al., 2012**) y a 500 mg/L en células SK-N-SH (**Li et al. 2012**), a 24 h de exposición. La diferencia en los resultados sugiere una toxicidad diferencial atribuida a la una susceptibilidad celular diferencial esta podría ser atribuida a la resistencia al daño oxidativo que exhiben los modelos celulares, en donde células del sistema inmune y neuronales poseen menor capacidad antioxidante en comparación con células hepáticas (**Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009**). En relación a tiempo de exposición se sabe que a mayor tiempo de exposición los efectos tóxicos inducidos por los OP pueden exacerbarse (**Karalliedde et al. 2003**). El mecanismo de inducción de citotoxicidad asociado con la exposición a MET es la apoptosis (Li et al., 2012), la cual puede ser desencadenada por la liberación del citocromo c de la mitocondria (**Saleh et al. 2003a, b**), además la disminución gradual de los sistemas antioxidantes como el GSH así como el incremento en el daño al DNA son factores que promueven la inducción de apoptosis por exposición a OP (**Banerjee et al. 2001**).

Interesantemente la viabilidad celular estimada por los ensayos de RN y de MTT mostraron comportamientos diferentes, ya que en el ensayo de MTT se observó una disminución en la viabilidad celular, mientras que este efecto no fue observado en el ensayo de RN. Se ha sugerido que si la estimación de la viabilidad celular es mayor en el ensayo de RN, en comparación con el ensayo de MTT, es posible que

el xenobiótico puede inducir el bloqueo de canales iónicos (**Weyermann et al. 2005**), también se ha observado estos mismos resultados en tóxicos que tienen la capacidad de dañar organelos intracelulares. En este sentido se ha determinado que el MET induce el bloqueo del canal iónico de calcio dependiente de voltaje en células SK-N-SH a concentraciones de 500 mg/L (**Li et al., 2012**), además recientemente se ha demostrado la capacidad del MET en la inducción de daño a organelos intracelulares en el tejido cerebral de *Paralichthys olivaceus* expuestos a 10 mg/L por 72 y 144 h (**Peng et al. 2015**). esto sugiere que el MET podría alterar canales iónicos y/o causar daño a organelos intracelulares en las células HepG₂, más estudios son necesarios para conocer el mecanismo de daño celular inducido por la exposición a MET en HepG₂.

Se observó que la exposición a MET induce el incremento en los niveles intracelulares de ROS. El mecanismo de inducción de ROS por exposición a OP puede ser atribuido a procesos de biotransformación de los OP, ya que durante el metabolismo del plaguicida se incrementa la tasas de ROS por procesos en los que se involucra al CYP-450 (Banerjee et al., 2001). Se conoce que el MET puede incrementar la síntesis del CYP-2W1 en células de neuroblastoma expuestas a 500 mg/L por 24 h (Li et al., 2012), esta isoforma se encuentra expresada en el hígado humano (**Moscovitz and Aleksunes 2013**), además en HepG₂ se expresan los citocromos CYP3A4, 1A2, 2B6 (**Westerink and Schoonen 2007**), los cuales están implicados en el metabolismo de los OP (Jokanović, 2001), por lo cual es posible que el incremento en ROS por la exposición a OP pueda ser atribuida a la inducción de CYP-450. Más estudios enfocados en determinar los cambios en la expresión de CYP450 en HepG₂ por exposición a MET deben ser realizados, además de la utilización de inhibidores farmacológicos de CYP-450 para conocer su participación en la inducción de estrés oxidativo en HepG₂ por la exposición a MET.

El incremento en el daño lipoperoxidativo se considera como un marcador de la inducción de estrés oxidativo (**Halliwell and Poulsen 2006**), este se origina por el ataque oxidativo de las ROS sobre los grupos metil de los ácidos grasos poliinsaturados (**Saquib et al. 2012**). En el presente estudio la exposición a 350 y

500 mg/L de MET induce el incremento en MAD en HepG2, a tiempos de exposición ≥ 48 h. La aparición de este biomarcador de daño oxidativo a periodos prolongados de exposición puede ser atribuido a la disminución del estatus antioxidante a en tiempos prolongados de exposición (**Schieber and Chandel 2014**). La inducción de MAD por la exposición a MET se ha observado en PBMC y en PC12 a dosis mayores de 10 mg/L a tiempos de 24 h, sin embargo en nuestro modelo de ensayo no se observa incremento en este marcador a la misma dosis de exposición lo cual sugiere la resistencia de HepG2 al daño oxidativo. La resistencia es atribuida a la alta actividad de catalasa que posee la línea celular (**Bai et al. 1999; Alia et al. 2005**). La aparición de MAD por exposición a OP como malatión, paratión y metilparatión también se han observado a 48 h tratamiento (**Moore et al. 2010; Edwards et al. 2013**). La determinación de los cambios en la actividad y expresión de los sistemas antioxidantes durante la exposición a MET en HepG2 deben de ser realizados para comprender el mecanismo de daño oxidativo y de cito-protección.

La inducción de estrés oxidativo por la exposición a OP se atribuye al incremento en las ROS durante su metabolismo, a la disrupción en los ciclos redox de las células y por la disminución en la capacidad antioxidante (**Banerjee et al. 2001; Kashyap et al. 2011; Mishra and Srivastava 2013**). En este sentido hemos determinado los cambios en GSH en HepG2 por la exposición a MET como un método generalizado para determinar el estatus antioxidante, ya que el GSH es el mayor antioxidante inespecífico en las células y su disminución es directamente proporcional a la disminución en sistemas antioxidantes específicos como SOD, GPx y CAT (**Tew and Townsend 2012**). Los resultados obtenidos demuestran que la exposición 48 y 96 h a MET promueven la depleción de GSH. La exposición a MET durante 24h reduce los niveles de GSH en células PC12 a dosis de 20 y 40 mg/L (Lu *et al.*, 2012), sin embargo en PBMCs no se observó modificaciones en los niveles de GSH a dosis de 3, 10 o 20 mg/L expuestos a 24 h (Ramirez-Vargas *et al.*, 2017).

En nuestro modelo de estudio los cambios en los niveles de GSH podrían ser explicados por el incremento en las ROS. Como se ha mencionado anteriormente

los niveles de ROS incrementan a 6 h de exposición, la reducción a tiempos de 48 o 96 h podrían atribuirse a la oxidación del GSH por ROS, esto con cuerda con la aparición de marcadores de daño oxidativo a 48 o 96 h, que sugiere la incapacidad de los sistemas antioxidantes para contrarrestar el daño oxidativo por exposiciones prolongadas a MET (**Araoud et al. 2014**). La determinación de más marcadores del estado antioxidante en HepG2 expuestas a MET son necesarios para conocer los probables mecanismos de citoprotección contra el daño oxidativo.

El daño genotóxico en células HepG2 por la exposición a MET fue observado, ya que existió un incremento en los parámetros utilizados para medir el daño al DNA (el porcentaje de DNA en cola “Tail intensity” y en la migración de éste “tail momento”). Diferentes mecanismos de toxicidad tales como la alquilación o la inducción de estrés oxidativo se han atribuido como la causa de genotoxicidad inducida por OP. Al respecto sea demostrado que el grupo funcional metoxifosfinil del MET tiene capacidad alquilante, e induce aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y mutaciones puntuales (**Wang et al. 2003**). Por otra parte, durante la inducción de estrés oxidativo el incremento exacerbado de ROS promueve la oxidación del DNA principalmente de las guaninas generando la base 8-oxo-2´deoxyguanosina (8-oxo-dG), el 8-oxo-dG puede inducir la tautomerización de las bases aledañas, traducándose en mutaciones puntuales en DNA (**Cooke et al. 2003**). Además, el MDA puede generar aductos en el DNA e inducir entrecruzamientos de DNA o proteínas (**Marnett 1999; Niedernhofer et al. 2003; De Bont and Van Larebeke 2004**)

En el presente estudio, probamos la eficacia del N-acetil-cisteína para reducir el efecto citotóxico, la inducción de estrés oxidativo y genotoxicidad, originados por la exposición a MET en células HepG2. Los resultados obtenidos muestran una clara reducción de estos parámetros, cuando las células son pre-tratadas con NAC. La NAC es la forma acetilada de L-cisteína lo cual la hace un compuesto tiólico, que posee un grupo sulfhidrilo estable, este antioxidante es metabolizado en un 90% por el hígado (**de Andrade et al. 2015**). El efecto citotóxico inducido por la exposición a plaguicidas organofosforados es un evento generado por modificaciones

bioquímicas, moleculares y/o celulares irreparables e irreversibles (**Barnes and Miner 2009**). Como se menciona anteriormente el mecanismo de muerte asociado con la exposición a OP es la apoptosis generalmente inducida por vías mitocondriales que involucran el incremento exacerbado en ROS y la subsecuente liberación del citocromo c (**Saleh et al. 2003a, b; Kashyap et al. 2011**). En nuestro modelo de estudio observamos la disminución del efecto citotóxico en células previamente tratadas con NAC, el mecanismo a través del cual la NAC protege del efecto citotóxico podría ser asociado con la disminución de ROS, y con la retención del citocromo c en la mitocondria. En este sentido se ha reportado que la NAC disminuye el efecto citotóxico en células PC12 expuestas a clorpirifos, este efecto citoprotector de la NAC se atribuyó a la disminución de ROS, lo cual permitió la retención del citocromo c en la mitocondria inhibiendo la inducción de apoptosis por la vía intrínseca (**Lee et al. 2012**).

La disminución de las especies reactivas del oxígeno en los cultivos pre tratados con NAC puede ser atribuido a la reacción de ROS con la NAC. La NAC es considerada por su estructura química como un carroñero específico de ROS, esta acción es generada por el grupo sulfhidrilo de la NAC, el cual se puede reaccionar con OH y formar H₂O disminuyendo el potencial oxidativo de ROS, el resultado de esta reacción es la generación de aniones tiólicos los cuales pueden reaccionar con H₂O₂, formando moléculas más estables y no reactantes (**Elbini Dhouib et al. 2016**). Además, la NAC promueve la transcripción de elementos de respuesta a antioxidantes (ARE), vía Nrf2 dentro de estos elementos de respuesta se encuentran enzimas antioxidantes como la SOD y CAT las cuales degradan al anión superóxido y al peróxido de hidrogeno respectivamente (**Cai et al. 2015**). Más estudios son necesarios para elucidar el mecanismo a través del cual la NAC protege de la inducción de ROS durante la exposición a MET.

La disminución de los niveles de ROS podría disminuir la lipoperoxidación y la oxidación del DNA, disminuyendo los niveles de MDA y de genotoxicidad (**De Flora et al. 2001**), tal como se observó en el presente estudio. Por otra parte, el pre-tratamiento con NAC inhibió la disminución de GSH en HepG2 expuestas a MET,

se sabe que NAC es un compuesto que promueve la síntesis de GSH en hepatocitos ya que proporciona la cisteína requerida para la síntesis de GSH (**Zafarullah et al. 2003**).

Conclusión.

Los resultados de este estudio demuestran que el efecto citotóxico, genotóxico inducido por la exposición a MET es generado por la inducción de estrés oxidativo. Además, son concordantes con el efecto protector de la NAC sobre la inducción de citotoxicidad, estrés oxidativo, daño genotóxico, en modelos celulares expuestos a diferentes OP (**Ahmed et al. 2009, 2010, 2011, Lee et al. 2012, 2014**), lo cual establece el potencial uso de la NAC para prevenir el efecto toxico asociado a la exposición a OP.

REFERENCIAS

Ahmed, T., Pathak, R., Mustafa, M.D., Kar, R., Tripathi, A.K., Ahmed, R.S., Banerjee, B.D., 2011. Ameliorating effect of N-acetylcysteine and curcumin on pesticide-induced oxidative DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. *Environ. Monit. Assess.* 179, 293–299. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1736-5>

Ahmed, T., Tripathi, A.K., Ahmed, R.S., Banerjee, B.D., 2010. Assessment of phosphamidon-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells: protective effects of N-acetylcysteine and curcumin. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24, 286–292. <https://doi.org/10.1002/jbt.20337>

Ahmed, T., Tripathi, A.K., Suke, S.G., Kumar, V., Ahmed, R.S., Das, S., Banerjee, B.D., 2009. Role of HSP27 and reduced glutathione in modulating malathion-induced apoptosis of human peripheral blood mononuclear cells: ameliorating effect of N-acetylcysteine and curcumin. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 23, 1319–1325. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.016>

Alia, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., Goya, L., 2005. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19, 119–128.

Araoud, M., Neffeti, F., Douki, W., Khaled, L., Najjar, M.F., Kenani, A., Houas, Z., 2014. Toxic effects of methamidophos on paraoxonase 1 activity and on rat kidney and liver and ameliorating effects of alpha-tocopherol. *Environ. Toxicol.* <https://doi.org/10.1002/tox.22095>

Aroor, A.R., DeMarco, V.G., 2014. Oxidative stress and obesity: the chicken or the egg? *Diabetes* 63, 2216–2218.

Bai, J., Rodriguez, A.M., Melendez, J.A., Cederbaum, A.I., 1999. Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J. Biol. Chem.* 274, 26217–26224.

Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S., 2001. Pesticide-Induced Oxidative Stress : Perspective and Trends. *Rev. Environ. Health* 16, 1–40. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2001.16.1.1>

Barnes, K.M., Miner, J.L., 2009. Role of resistin in insulin sensitivity in rodents and humans. *Curr. Protein Pept. Sci.* 10, 96–107.

Cai, Z., Lou, Q., Wang, F., Li, E., Sun, J., Fang, H., Xi, J., Ju, L., 2015. N-acetylcysteine protects against liver injure induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 8655–8662.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195–1214.

Costa, C., Gangemi, S., Giambò, F., Rapisarda, V., Caccamo, D., Fenga, C., 2015. Oxidative stress biomarkers and paraoxonase 1 polymorphism frequency in farmers occupationally exposed to pesticides. *Mol. Med. Rep.* 12, 6353–6357.

de Andrade, K.Q., Moura, F.A., dos Santos, J.M., de Araújo, O.R.P., de Farias Santos, J.C., Goulart, M.O.F., 2015. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 30269–30308. <https://doi.org/10.3390/ijms161226225>

De Bont, R., Van Larebeke, N., 2004. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19, 169–185.

De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Balansky, R.M., 2001. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 22, 999–1013. <https://doi.org/10.1093/carcin/22.7.999>

Ecobichon, D.J., 2001. Pesticide use in developing countries. *Toxicology* 160, 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00452-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00452-2)

Edwards, F.L., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B., 2013. Involvement of oxidative stress in methyl parathion and parathion-induced toxicity and genotoxicity to human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ. Toxicol.* 28, 342–348. <https://doi.org/10.1002/tox.20725>

- Ehrich, M., Van Tassell, R., Li, Y., Zhou, Z., Kepley, C.L., 2011. Fullerene antioxidants decrease organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition in vitro. *Toxicol. In Vitro* 25, 301–307.
- Elbini Dhouib, I., Jallouli, M., Annabi, A., Gharbi, N., Elfazaa, S., Lasram, M.M., 2016. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci.* 151, 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.003>
- Emerick, G.L., DeOliveira, G.H., Oliveira, R.V., Ehrich, M., 2012. Comparative in vitro study of the inhibition of human and hen esterases by methamidophos enantiomers. *Toxicology* 292, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.12.004>
- Halliwell, B., Poulsen, H., 2006. Oxidative Stress, in: Halliwell, B.B., Poulsen, H.E. (Eds.), *Cigarette Smoke and Oxidative Stress*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–4.
- Jallouli, M., Dhouib, I.E.B., Dhouib, H., Lasram, M., Gharbi, N., El Fazaa, S., 2016. Disruption of steroidogenesis after dimethoate exposure and efficacy of N-acetylcysteine in rats: an old drug with new approaches. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 7975–7984.
- Jokanović, M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166, 139–160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)
- Kamanyire, R., Karalliedde, L., 2004. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup. Med.* 54, 69–75.
- Karalliedde, L.D., Edwards, P., Marrs, T.C., 2003. Variables influencing the toxic response to organophosphates in humans. *Food Chem. Toxicol.* 41, 1–13.
- Kashyap, M.P., Singh, A.K., Kumar, V., Tripathi, V.K., Srivastava, R.K., Agrawal, M., Khanna, V.K., Yadav, S., Jain, S.K., Pant, A.B., 2011. Monocrotophos Induced Apoptosis in PC12 Cells: Role of Xenobiotic Metabolizing Cytochrome P450s. *PLoS ONE* 6, e17757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017757>
- Lee, J.E., Lim, M.S., Park, J.H., Park, C.H., Koh, H.C., 2014. Nuclear NF- κ B contributes to chlorpyrifos-induced apoptosis through p53 signaling in human neural precursor cells. *Neurotoxicology* 42, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.04.001>
- Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C., Koh, H.C., 2012. Reactive oxygen species regulated mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells exposed to chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263, 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.06.005>
- Li, T., Zhao, H., Hung, G.-C., Han, J., Tsai, S., Li, B., Zhang, J., Puri, R.K., Lo, S.-C., 2012. Differentially expressed genes and pathways induced by

organophosphates in human neuroblastoma cells. *Exp. Biol. Med.* 237, 1413–1423. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012178>

Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 674, 137–147.

Lu, X.T., Ma, Y., Wang, C., Zhang, X.F., Jin, D.Q., Huang, C.J., 2012. Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *J. Environ. Sci. Health B* 47, 445–454. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.663312>

Lukaszewicz-Hussain, A., 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.006>

Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 424, 83–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00010-X)

Mishra, V., Srivastava, N., 2013. Organophosphate pesticides-induced changes in the redox status of rat tissues and protective effects of antioxidant vitamins. *Environ. Toxicol.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/tox.21924>

Moore, P.D., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B., 2010. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ. Toxicol.* 25, 221–226. <https://doi.org/10.1002/tox.20492>

Moscovitz, J.E., Aleksunes, L.M., 2013. Establishment of metabolism and transport pathways in the rodent and human fetal liver. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23801–23827.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2016. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.* 1–51. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>

Niedernhofer, L.J., Daniels, J.S., Rouzer, C.A., Greene, R.E., Marnett, L.J., 2003. Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 31426–31433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212549200>

Organization, W.H., 2010. WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009. World Health Organization.

Peng, H.-F., Bao, X.-D., Zhang, Y., Huang, L., Huang, H.-Q., 2015. Identification of differentially expressed proteins of brain tissue in response to methamidophos in

flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 44, 555–565. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.028>

Ramirez-Vargas, M.A., Huerta-Beristain, G., Guzman-Guzman, I.P., Alarcon-Romero, L. del C., Flores-Alfaro, E., Rojas-Garcia, A.E., Moreno-Godinez, M.E., 2017. Methamidophos induces cytotoxicity and oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells. *Environ. Toxicol.* 32, 147–155. <https://doi.org/10.1002/tox.22220>

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>

Roberts, R.A., Laskin, D.L., Smith, C.V., Robertson, F.M., Allen, E.M.G., Doorn, J.A., Slikker, W., 2009. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 112, 4–16. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp179>

Saleh, A. M., Vijayasathy, C., Fernandez-Cabezudo, M., Taleb, M., Petroianu, G., 2003. Influence of paraoxon (POX) and parathion (PAT) on apoptosis: a possible mechanism for toxicity in low-dose exposure. *J. Appl. Toxicol.* 23, 23–29.

Saleh, A M, Vijayasathy, C., Masoud, L., Kumar, L., Shahin, A., Kambal, A., 2003. Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 190, 47–57.

Sánchez-Guerra, M., Pérez-Herrera, N., Quintanilla-Vega, B., 2011. Organophosphorous pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental approaches. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 681–691. <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.602130>

Saqib, Q., Attia, S.M., Siddiqui, M.A., Aboul-Soud, M.A.M., Al-Khedhairi, A.A., Giesy, J.P., Musarrat, J., 2012. Phorate-induced oxidative stress, DNA damage and transcriptional activation of p53 and caspase genes in male Wistar rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.006>

Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>

Schreinemachers, P., Tipraqsa, P., 2012. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy* 37, 616–626.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.

- Tew, K.D., Townsend, D.M., 2012. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 1728–1737. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4640>
- Vidyasagar, J., Karunakar, N., Reddy, M.S., Rajnarayana, K., Surender, T., Krishna, D.R., 2004. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian J. Pharmacol.* 36, 76.
- Wang, T.C., Lin, C.-M., Lo, L.-W., 2003. Genotoxicity of Methoxyphosphenyl insecticide in Mammalian cells. *Zool. Stud.* 42, 462–469.
- Westerink, W.M.A., Schoonen, W.G.E.J., 2007. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 1581–1591. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.05.014>
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.09.018>
- Yasukawa, T., Tokunaga, E., Ota, H., Sugita, H., Martyn, J.J., Kaneki, M., 2005. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 280, 7511–7518.
- Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003. Molecular mechanisms of *N*-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 6–20. <https://doi.org/10.1007/s000180300001>

Figuras

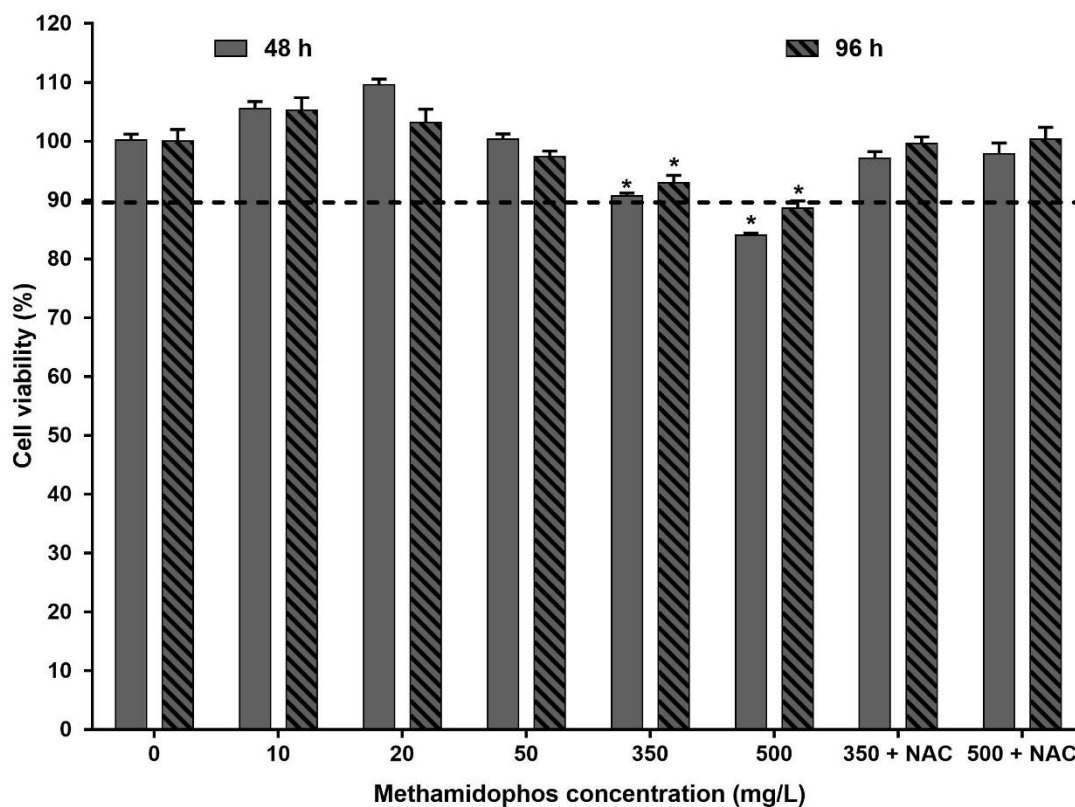


Figura 1. Efecto citotóxico del MET sobre HepG2 estimado por MTT. HepG2 fueron incubadas con diferentes concentraciones de MET y diferentes tiempos de exposición, posteriormente el % de viabilidad celular fue determinado por el ensayo de MTT. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). La línea punteada indica el valor referente para un efecto citotóxico. NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

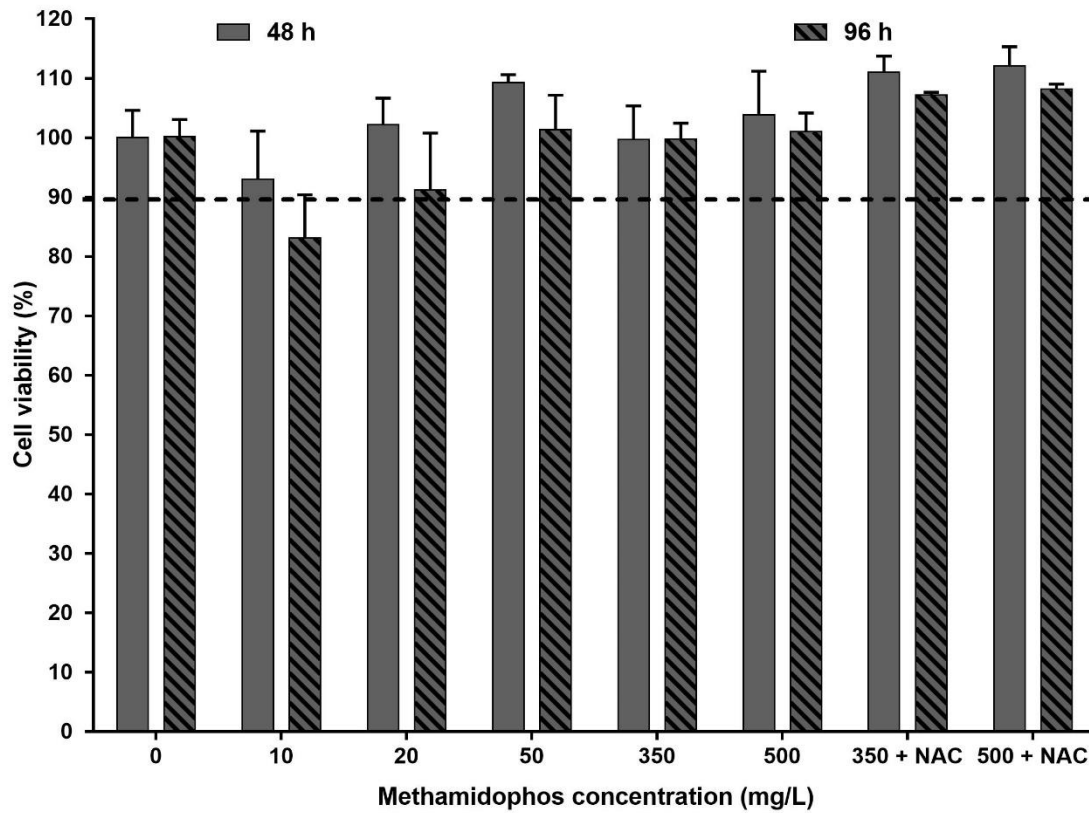


Figura. 2. Efecto citotóxico del MET sobre HepG2 estimado por RN. HepG2 fueron incubadas con diferentes concentraciones de MET y diferentes tiempos de exposición, posteriormente el % de viabilidad celular fue determinado por el ensayo de RN. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, “DMSO” (0 mg/L). La línea punteada indica el valor referente para un efecto citotóxico. NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

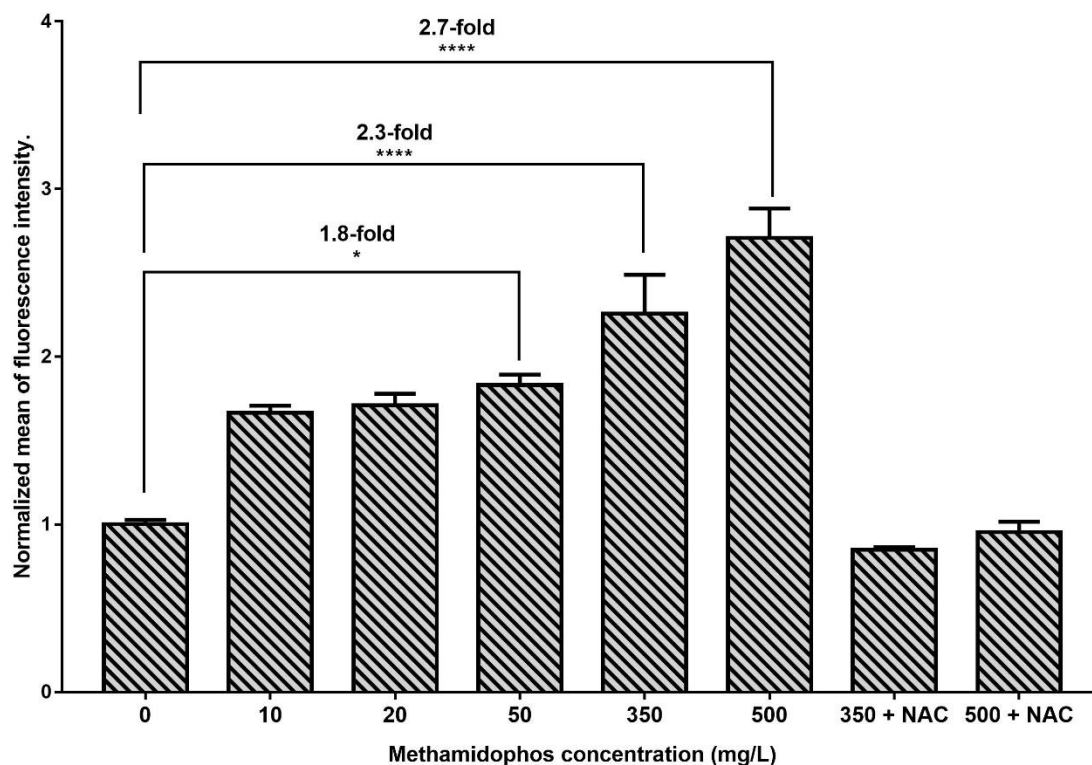


Figura. 3. Efecto del MET sobre la inducción de ROS HepG2. HepG2 fueron incubadas con diferentes concentraciones de MET por 6h de exposición, posteriormente la producción de ROS fue monitoreada. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, “DMSO” (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

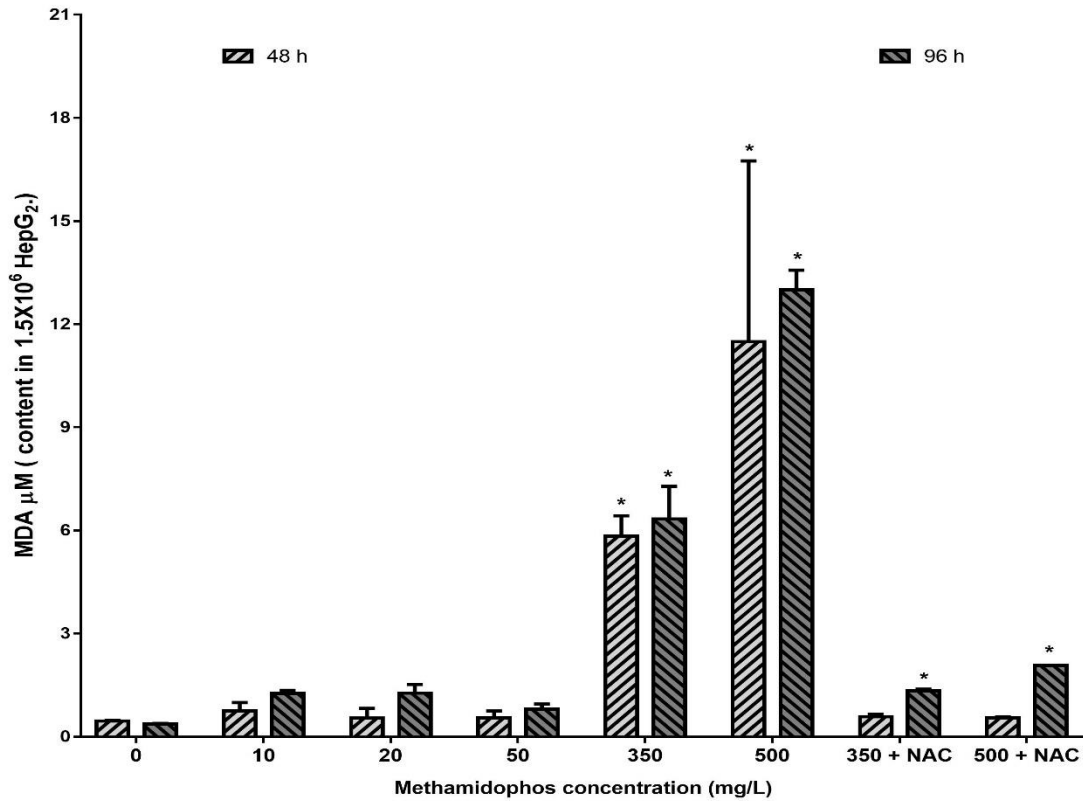


Figura. 4. Efecto del MET sobre la generación de lipoperoxidación en HepG2. HepG₂ fueron incubadas con diferentes concentraciones de MET y diferentes tiempos de exposición, posteriormente la cantidad de malonaldehído fue estimada. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, “DMSO” (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

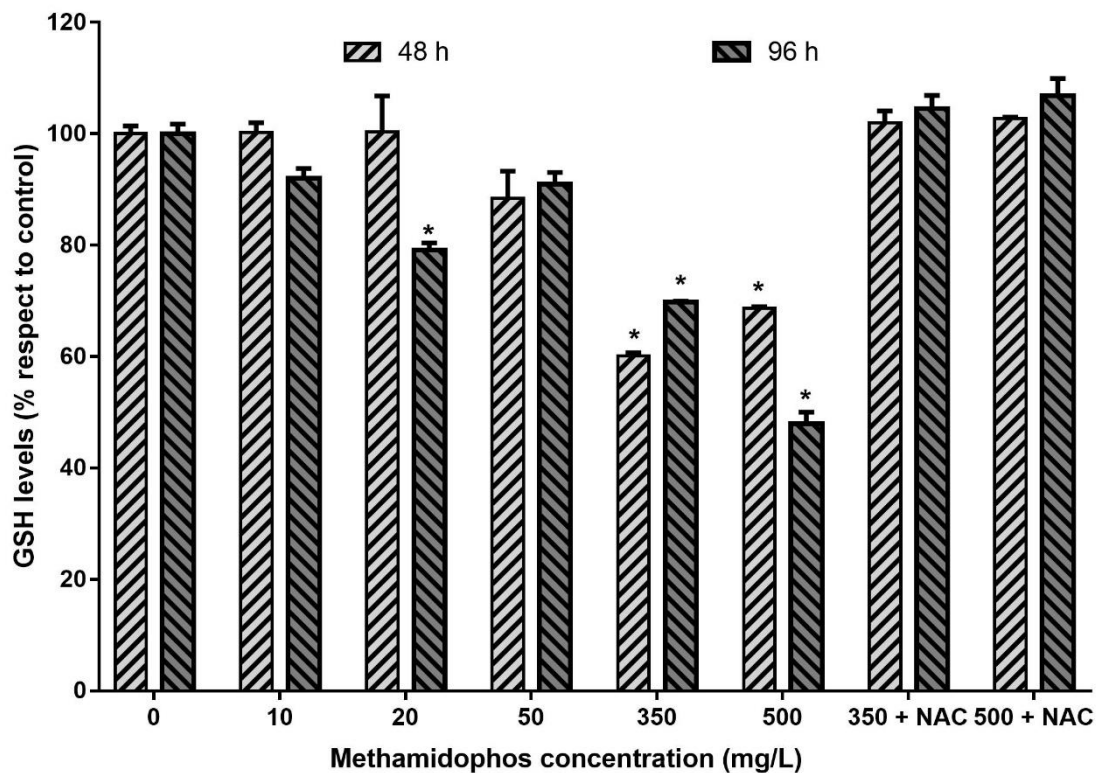


Figura. 5. Efecto del MET sobre los niveles de GSH en HepG2. HepG2 fueron incubadas con diferentes concentraciones de MET y diferentes tiempos de exposición, posteriormente los niveles de GSH fueron determinados. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetil-cisteína (10 mM).

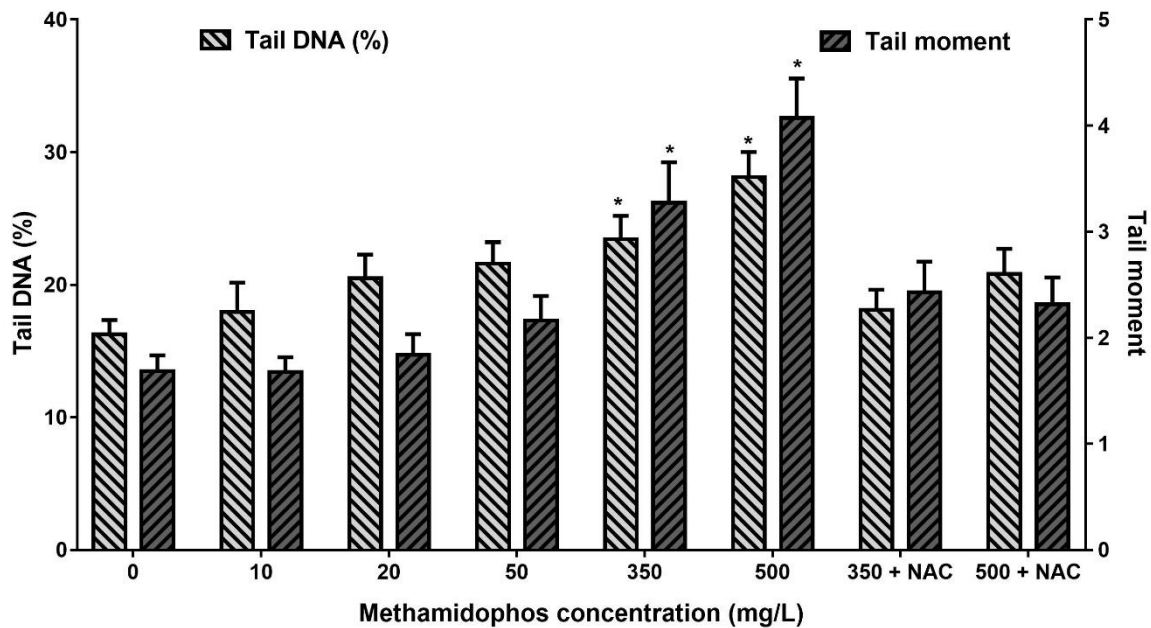


Figura. 6. Efecto del MET sobre el daño al DNA en HepG2. HepG2 fueron incubadas con diferentes concentraciones de MET por 48 h, posteriormente el daño al DNA fue valorado. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetilcisteína (10 mM).

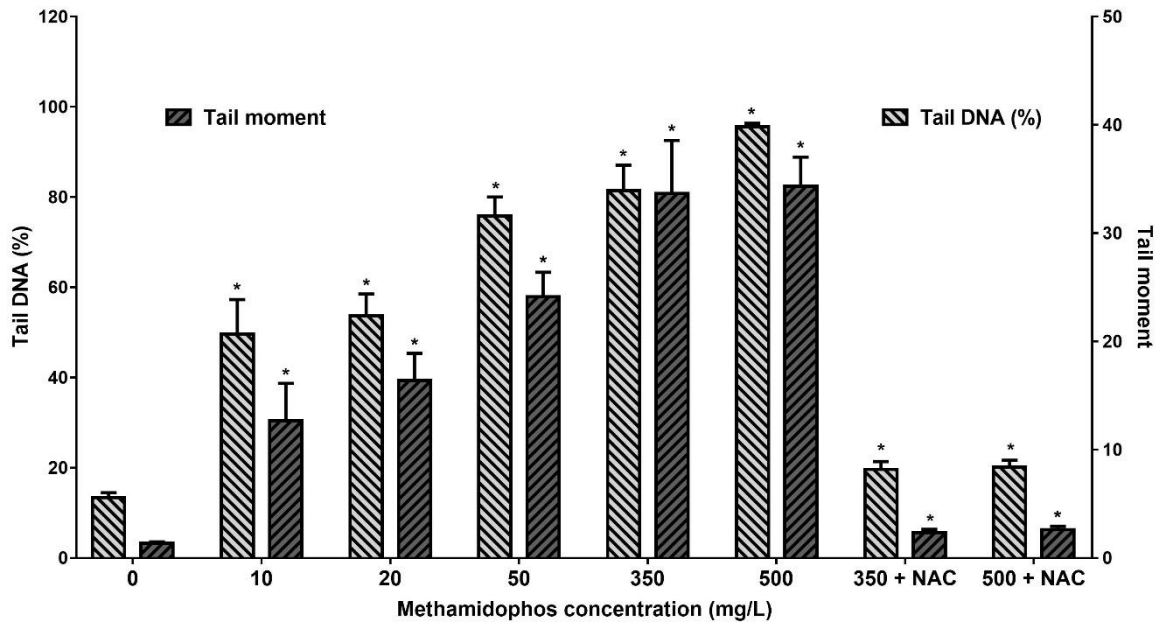


Figura. 7. Efecto del MET sobre el daño al DNA en HepG2. HepG2 fueron incubadas con diferentes concentraciones de MET por 96 h, posteriormente el daño al DNA fue valorado. *diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las células tratadas con MET y el control de vehículo, "DMSO" (0 mg/L). NAC: pretratamiento con N-acetilcisteína (10 mM).